

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SARAH DA COSTA AMARAL

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS
DE GLIOBLASTOMA HUMANO DE PECTINAS DA POLPA DE GABIROBA
(*Campomanesia xanthocarpa* Berg)**

CURITIBA

2018

SARAH DA COSTA AMARAL

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS
DE GLIOBLASTOMA HUMANO DE PECTINAS DA POLPA DE GABIROBA
(*Campomanesia xanthocarpa* Berg)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), no Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Orientadora: Prof^a Dr^a Joana Léa Meira Silveira
Coorientadora: Prof^a Dr^a Sheila Maria Brochado Winnischofer

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Amaral, Sarah da Costa

Purificação, caracterização química e efeito citotóxico em células de glioblastoma humano de pectinas da polpa de gabirola (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). / Sarah da Costa Amaral. – Curitiba, 2018.
107 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Joana Léa Meira Silveira

Co-orientadora: Sheila Maria Brochado Winnischofer

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Glioblastoma 2. Pectina 3. Citotoxicidade 4. Myrtaceae I. Título II. Silveira, Joana Léa Meira III. Winnischofer, Sheila Maria Brochado IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 616.99481



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SARAH DA COSTA AMARAL** intitulada: **PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO DE PECTINAS DA POLPA DE GABIROBA (*Capomanesia xanthocarpa* Berg)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Março de 2018.


JORINA LEÁ MEIRA SILVEIRA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



SELENE ELIFIO ESPOSITO

Avaliador Externo (PUC/PR)


NEOLILUCYSZYN

Avaliador Externo (PUC/PR)



GLÁUCIA REGINA MARTINEZ

Avaliador Interno (UFPR)

Aos meus pais, Marilene e Amaral (*in
memorian*), ao meu irmão, Melque, e ao meu
companheiro de todos os momentos, Gabriel,
por todo apoio, força e incentivo essenciais
durante a caminhada da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me guiar com a Sua luz divina.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a. Joana Léa Meira Silveira, pela dedicação em ensinar, por sempre confiar no meu trabalho, por estar sempre disposta a contribuir da melhor maneira possível, pelo apoio amigo e carinho.

À minha coorientadora Prof^a Dr^a. Sheila Maria Brochado Winnischofer, por aceitar colaborar com o desenvolvimento desse trabalho com muita disposição e dedicação, pela disponibilidade e incentivo mesmo nos momentos de dificuldade.

À Dr^a. Shayla Fernanda Barbieri, pelo acolhimento e parceria, pela enorme contribuição em todas as etapas desse trabalho e pela amizade. Pessoa muito querida que eu admiro muito!

À banca examinadora, Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez, Profa. Dra. Neoli Lucyszyn Suckow e Profa. Dra. Selene Elifio Esposito pelas contribuições, avaliação e correção deste trabalho.

À Embrapa-Florestas, em especial a Dr^a. Rossana Catie Bueno de Godoy e Dr^a. Maria Cristina Medeiros Mazza, por nos ceder a polpa de gabioba e tornar possível o desenvolvimento desse projeto.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki e Dr. Arquimedes, pelas análises de RMN.

Aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Especialmente à Elisângela, pelas análises de HPSEC-MALLS-RI e HPAEC-PAD, pela disposição, amizade e carinho. À Rosane, pelas análises de CG-EM.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica,

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À minha amada família, por sempre acreditar no meu potencial e fazer o possível e o impossível para que eu seguisse o sonho da carreira científica.

Ao meu querido namorado Gabriel, companheiro do lar e das lutas da vida, que embarcou comigo nessa jornada desde o momento que decidi por esse caminho, pela força e incentivo diário sem os quais não seria possível chegar até aqui.

Ao grupo de Carboidratos, em especial, as amigas e parceiras da luta diária: Shayla, Nicole, Cris, Ester, Estela, Fran e Tati, vocês são muito importantes pra mim e admiro cada uma com sua maneira particular de ser!

Ao grupo de oxidações biológicas, em especial, a Ju Bark e Lisley, não tenho palavras para dizer o quanto sou grata por tudo que fizeram por mim, sempre dispostas a ajudar, com paciência para ensinar e pela parceria até nos momentos difíceis!

À Ester, pessoa de coração gigantesco, que não mede esforços para ajudar em qualquer situação. Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial depois de tanto apoio que recebi nos momentos que eu mais precisei!

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse desenvolvido com sucesso;

Muito obrigada!

Independente de quais sejam os obstáculos e as dificuldades, esteja convicto de uma inabalável determinação e amor em suas atitudes. O resultado irrefutavelmente será colheita.

(ZAIKA CAPITA)

RESUMO

A flora brasileira detém a maior diversidade do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas. Entretanto, grande quantidade de espécies de frutos exóticos nativos continuam pouco explorados. A *Campomanesia xanthocarpa* Berg, conhecida popularmente como gabioba, é uma espécie nativa de árvore frutífera lenhosa pertencente à família Myrtaceae que, apesar de ser utilizada pela medicina tradicional para o tratamento de diversos tipos de patologias, ainda permanece com uso e comercialização restritos. Alguns estudos têm comprovado o potencial farmacológico da gabioba, nos quais foram descritas diversas propriedades biológicas para extratos de folhas, sementes e frutos, como: redução da obesidade, da glicemia e dos níveis de colesterol, além de apresentarem atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Apesar disso, a maioria dos trabalhos descritos na literatura associam as propriedades medicinais da *C. xanthocarpa* aos compostos de baixa massa molar presentes no extratos e, até o presente momento, inexistem estudos que relacione a atividade biológica com os polissacarídeos presentes na polpa desse fruto. Nos últimos anos, as pectinas comerciais vem sendo investigadas quanto às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumoral. Neste contexto, os glioblastomas, um dos tumores malignos mais letais em humanos e mais prevalentes do cérebro, foram escolhidos no presente trabalho como modelo a ser testado para avaliar o potencial antitumoral das pectinas de polpa de gabioba. Para atingir este objetivo, as pectinas extraídas da polpa de gabioba foram caracterizadas estruturalmente e avaliadas quanto ao efeito citotóxico. A fração bruta GW extraída da polpa de gabioba com água quente foi submetida a processos de fracionamento por congelamento e degelo e tratamento com solução de Fehling, obtendo-se a fração purificada GWP-FP-S. Através da análise de HPSEC-MALLS-RI foi possível observar o perfil homogêneo da fração GWP-FP-S, a qual apresentou massa molar de $29.170 \text{ g mol}^{-1}$. A análise de composição monossacarídica da fração GWP-FP-S resultou em ácido galacturônico (58,8%), arabinose (28,5%), galactose (11,3%) e ramnose (1,1%). 57,7% da cadeia de GWP-FP-S foi atribuída a homogalacturonana (HG) e 42,0% a ramnogalacturonana do tipo I (RG-I). A presença dessas cadeias foram confirmadas pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D). As fração bruta (GW) e purificada (GWP-FP-S) foram analisadas quanto ao efeito citotóxico em células de glioblastoma humano (U251-MG) e em células não tumorais (NIH 3T3). Ambas as frações obtidas da polpa da gabioba induziram citotoxicidade em células U251-MG (19,55-37,65% de inibição da viabilidade celular) quando avaliadas pelos métodos de MTT e cristal violeta, após 48h de tratamento nas concentrações de $10\text{-}400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em contraste, tanto GW quanto GWP-FP-S não foram citotóxicas para células NIH 3T3 nas condições testadas. A caracterização estrutural das frações pécicas de polpa de gabioba associadas ao efeito citotóxico em células de glioblastoma humano contribuem para valorização da espécie bem como sua preservação. Vale ressaltar que o presente estudo descreve pela primeira vez, o potencial antitumoral de polissacarídeos extraídos de frutos da família Myrtaceae e o efeito citotóxico de pectinas em células de glioblastoma humano.

Palavras-chave: *Campomanesia xanthocarpa* Berg. Gabioba. Família Myrtaceae Pectinas. Purificação. Estrutura química. Citotoxicidade. Glioblastoma.

ABSTRACT

The Brazilian flora harbors the world's largest diversity, presenting over 55,000 catalogued species. However, several exotic native fruits continue to be underexploited. *Campomanesia xanthocarpa* Berg, popularly known as gabioba, is one of Brazilian native edible specie of the Myrtaceae family used in folk medicine to treat different pathologies, however, the use and commercialization are still restrict. Scientific studies have been confirmed that the leaves and fruit extracts of *C. xanthocarpa* exhibits a broad spectrum of therapeutic effects, including reduction of obesity, glycemia and cholesterol levels, in addition to antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties. However, most of the previously studies attributed the aforementioned health benefits to low molar mass compounds contained on the extracts of *C. xanthocarpa*, and, since to date, reports about the bioactivity of polysaccharides from gabioba pulp was not found. In recent decades, commercial pectins have been attracted attention due to their antioxidant, anti-inflammatory and antitumor properties. In this context, glioblastoma, the most frequent and lethal primary malignant brain tumor, was selected in the present work as a model to evaluate the antitumor potential of pectins from gabioba pulp. Thus, to achieve this aim, the pectins extracted from the gabioba pulp had its chemical structures characterized and evaluated for its cytotoxic effect. A crude pectin GW extracted with hot water from gabioba pulp was subjected to freeze-thawing processes and fractionation with Fehling's solution, yielding a purified GWP-FP-S fraction. By HPSEC-MALLS-RI analysis, it was possible to observe the homogeneous profile of GWP-FP-S fraction, which had molar mass of $29,170 \text{ g mol}^{-1}$. The monosaccharide composition showed that this fraction was composed of galacturonic acid (58.8%), arabinose (28.5%), galactose (11.3%) and rhamnose (1.1%). 57.7% of GWP-FP-S chain was attributed to homogalacturonans (HG) and 42.0% to type I rhamnogalacturonans (RG-I). The presences of those chains were confirmed through ^1H and ^{13}C NMR (1D and 2D) analyzes. Crude (GW) and purified (GWP-FP-S) fractions were evaluated for their cytotoxic effects on human glioblastoma (U251-MG) and normal (NIH 3T3) cells. Both fractions obtained from gabioba pulp induced cytotoxicity (19.55-37.65% of cell viability inhibition) on U251-MG cells when evaluated by MTT and crystal violet assay, at $10\text{-}400 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, 48 h of treatment. In contrast, both GW and GWP-FP-S showed no cytotoxicity for normal NIH 3T3 cells at tested conditions. The structural characterizations of the pectic fractions isolated from gabioba pulp, associated with the evaluation of cytotoxic effect on human glioblastoma cell contribute to the preservation and valorization of this species. It is noteworthy that the present study is reporting for the first time, the antitumor potential of polysaccharides extracted from Myrtaceae family's fruits and on the cytotoxicity of these polysaccharides on glioblastoma cells.

Key-words: *Campomanesia xanthocarpa* Berg. Gabioba. Myrtaceae family. Pectins. Purification. Chemical structure. Cytotoxicity. Glioblastoma.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1 - GABIROBA (*Campomanesia xanthocarpa* BERG) (A) ESTADOS BRASILEIROS ONDE OCORRE A GABIROBA. (B) GABIROBEIRA. (C) FRUTOS DE GABIROBA VERDES E MADUROS..... 24
- FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DAS PECTINAS..... 35

ARTIGO I

PURIFICATION, CHEMICAL CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC EFFECT ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS OF PECTINS FROM GABIROBA (*CAMPOMANESIA XANTHOCARPA* BERG) PULP

- FIGURA1 - SCHEME OF PURIFICATION OF FRACTION GWP-FP-S FROM GABIROBA PULP (*Campomanesia xanthocarpa* BERG). 60
- FIGURA 2 - HPSEC-MALLS-RI ELUTION PROFILE. (A) ELUTION PROFILE BY RI TO THE FRACTIONS GW, GWP AND GWP-FP-S OBTAINED FROM THE GABIROBA PULP (B) FRACTION GWP-FP-S. MOLAR MASS DISTRIBUTION, LIGHT SCATTERING (90°) AND REFRACTIVE INDEX (RI)..... 66
- FIGURA 3 - ^{13}C NMR SPECTRUM OF THE FRACTION GWP-FP-S FROM THE PULP OF GABIROBA FRUITS, OBTAINED AT 70°C IN D₂O (CHEMICAL SHIFTS ARE EXPRESSED IN δ , PPM)..... 69
- FIGURA 4 - $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC- NMR SPECTRUM OF THE FRACTION GWP-FP-S FROM THE PULP OF GABIROBA FRUITS, OBTAINED AT 70 °C IN D₂O (CHEMICAL SHIFTS ARE EXPRESSED IN δ , PPM)..... 70

FIGURA 5 - CYTOTOXIC EFFECT OF GW AND GWP-FP-S PECTINS ON GLIOBLASTOMA CELL LINE. U251-MG CELLS WERE TREATED WITH GW OR GWP-FP-S AT DIFFERENT CONCENTRATIONS (10-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) FOR 48 H (A) MTT ASSAY (B) CRYSTAL VIOLET ASSAY. THE VALUES REPRESENT THE MEANS \pm SD OF PERCENTAGE OF CELLS COMPARED WITH THE CONTROL (DATA REPRESENT AT LEAST THREE INDEPENDENT EXPERIMENTS, EACH IN QUADRUPLICATE) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. MORPHOLOGY OF U251-MG CELLS: (C) CONTROL GROUP (CELLS TREATED WITH VEHICLE). (D) CELLS TREATED WITH GW AT 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (E) CELLS TREATED WITH GWP-FP-S AT 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. MAGNIFICATION 100X 72

FIGURA 6 - CYTOTOXIC EFFECT OF GW AND GWP-FP-S PECTINS ON NORMAL FIBROBLAST CELLS. NIH 3T3 CELLS WERE TREATED WITH GW OR GWP-FP-S AT DIFFERENT CONCENTRATIONS (10-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) FOR 48 H AND MTT ASSAY WERE PERFORMED. THE VALUES REPRESENT THE MEANS \pm SD OF PERCENTAGE OF METABOLICALLY ACTIVE CELLS COMPARED WITH THE CONTROL (DATA REPRESENT AT LEAST THREE INDEPENDENT EXPERIMENTS, EACH IN QUADRUPLICATE) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001..... 74

FIGURA SUPPLEMENTAR 1 - HIGH PERFORMANCE ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY WITH PULSE AMPEROMETRIC DETECTION (HPAEC-PAD) CHROMATOGRAMS FOR IDENTIFICATION OF URONIC ACIDS. (A) CHROMATOGRAM OF GALACTURONIC ACID STANDARD (RETENTION TIME: 44.9 MIN); (B) CHROMATOGRAM OF GLUCURONIC ACID STANDARD (RETENTION TIME: 46.2 MIN); (C) CHROMATOGRAM OF HYDROLYZED GWP-FP-S (RETENTION TIME: 44.4 MIN)..... 77

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA GABIROBA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i>).....	29
TABELA 2 - ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PECTINAS EXTRAIDAS DE DIFERENTES FONTES VEGETAIS	46

ARTIGO I

PURIFICATION, CHEMICAL CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC EFFECT ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS OF PECTINS FROM GABIROBA (*CAMPOMANESIA XANTHOCARPA* BERG) PULP

TABELA 1 - COMPOSITION OF CRUDE AND PURIFIED PECTIN FRACTIONS EXTRACTED FROM GABIROBA PULP	67
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	- Deslocamento químico
^{13}C -RMN	- Ressonância magnética nuclear de carbono 13
^1H -RMN	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
AAS	- Ácido acetilsalicílico
ABTS	- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
AceA	- Ácido acérico
AG	- Arabinogalactana
AG-I	- Arabinogalactana do tipo I
AG-II	- Arabinogalactana do tipo II
ANOVA	- Análise de variância
AOPPs	- Produtos Proteicos de Oxidação Avançada.
Api	- Apiose
Ara	- Arabinose
BHA	- Hidroxianisol butilado
BHT	- Hidroxitolueno butilado
CRD	- Domínio de reconhecimento de carboidratos
D ₂ O	- Óxido de deutério
DA	- Grau de acetil-esterificação
DCFH-DA	- 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato
DE	- Grau de esterificação
Dha	- Ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico
DM	- Grau de metil-esterificação
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPPH	- 1,1-difenil-2- picrilhidrazila
ERO	- Espécies reativas de oxigênio
FBS	- Soro fetal bovino
FRAP	- Poder antioxidante de redução do ferro
Fuc	- Fucose
Gal	- Galactose
Gal-1	- Galectina-1
Gal-3	- Galectina-3
GalA	- Ácido galacturônico

GBM	- Glioblastoma
Glc	- Glucose
GlcA	- Ácido glucurônico
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HG	- Homogalacturonana
HM	- Alto grau de esterificação
HPAEC-PAD	- Cromatografia de troca iônica de alta performance acoplada a detector de pulso amperométrico
HPSEC	- Cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance
HSQC	- Espectroscopia de correlação heteronuclear <i>Single-Quantum</i>
IMA	- Albumina Modificada pela Isquemia
INCA	- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Kdo	- Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LCP	- Pectina cítrica de baixa massa molar
LM	- Baixo grau de esterificação
MALLS	- Espalhamento de luz laser com multiângulos
Man	- Manose
MCP	- Pectina cítrica modificada
MIC	- Concentração inibitória mínima
MTS	- 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Mw	- Massa molar ponderal média
Nox	- Metabólitos de óxido nítrico
O ₂ ⁻	- Ânion radical superóxido
OGA	- Oligogalacturonídeo
ppm	- Partes por milhão
Rha	- Rhamnose
RG	- Ramnogalacturonana
RG-I	- Ramnogalacturonana do tipo I
RG-II	- Ramnogalacturonana do tipo II
RI	- Índice de refração
SNC	- Sistema Nervoso Central

- UA - Ácido urônico
- Xyl - Xilose

Siglas das frações pécticas extraídas da polpa de gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg)

- GW - Fração péctica bruta obtida por extração aquosa à quente
- GWS - Fração sobrenadante de GW após etapa de congelamento e degelo
- GWP - Fração precipitada de GW após etapa de congelamento e degelo
- GWP-FS - Fração sobrenadante de GWP após tratamento com solução de Fehling
- GWP-FP - Fração precipitada de GWP após tratamento com solução de Fehling
- GWP-FP-S - Fração solúvel em água de GWP-FP após precipitação em membrana de diálise

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Objetivo Geral.....	21
1.1.2	Objetivos Específicos.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	BIOATIVOS: POTENCIAL DE FRUTOS BRASILEIROS.....	22
2.2	<i>Campomanesia xanthocarpa</i> BERG.....	24
2.2.1	Propriedades medicinais da gabioba.....	26
2.3	PECTINAS: ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	33
2.4	PECTINAS: ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	39
2.4.1	Pectinas: atividade antitumoral.....	42
2.4.1.1	Mecanismo de ação antitumoral das pectinas.....	42
2.5	GLIOMAS.....	52
3	ARTIGO I.....	55
	PURIFICATION, CHEMICAL CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC EFFECT ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS OF PECTINS FROM GABIROBA (<i>Campomanesia xanthocarpa</i> BERG) PULP.....	55
	ABSTRACT.....	56
1	INTRODUCTION.....	57
2	MATERIALS AND METHODS.....	59
2.1	Extraction and purification of pectic polysaccharides from gabioba pulp....	59
2.2	Monosaccharide composition.....	61
2.3	High performance size exclusion chromatography coupled to multidetectors (HPSEC-MALLS-RI).....	61
2.4	Protein quantification.....	62
2.5	Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.....	62
2.6	Cell culture and treatment with pectic fractions.....	63
2.7	Cytotoxicity assay.....	63
2.8	Statistical analysis.....	64
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	64
3.1	Structural characterization of purified fraction extracted from gabioba pulp....	64

3.2	Cytotoxic effect of crude and purified pectin fractions extracted from gabioba pulp	71
4	CONCLUSION	75
	ACKNOWLEDGEMENTS	76
	SUPPLEMENTARY FIGURE	77
	REFERENCES	78
4	CONCLUSÕES E CONTRIBUIÇÕES.....	87
	REFERÊNCIAS	89

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação apresenta os resultados em formato de artigo científico de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná.

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira é considerada como a detentora da maior diversidade do mundo, com grande quantidade de espécies de frutos exóticos nativos, os quais são pouco explorados. A aplicação dos frutos nativos brasileiros na indústria alimentícia e farmacêutica, bem como os benefícios para a saúde vêm sendo estudados nas últimas décadas, demonstrando um enorme potencial para descobertas de compostos bioativos. Uma das famílias de árvores frutíferas de maior importância ecológica no país é a família Myrtaceae, devido à quantidade de espécies comestíveis e utilizadas na medicina tradicional (SERAGLIO et al., 2018; DONADO-PESTANA et al., 2018).

Dentre as espécies frutíferas da família Myrtaceae, destaca-se a gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) que, apesar de ser utilizada pela medicina tradicional para o tratamento de diversos tipos de doenças (DICKEL; RATES; RITTER, 2007), ainda permanece com uso e comercialização restritos, com exceção do consumo *in natura* ou em formulações alimentícias como geleias, doces e sorvetes de forma artesanal.

Alguns estudos têm comprovado o uso etnofarmacológico da gabioba (*C. xanthocarpa*), nos quais foram descritas diversas propriedades farmacológicas para extratos de folhas e frutos, como: redução do peso, da glicemia, de triglicerídeos, do LDL, além de atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, entre outros (BIAVATTI et al., 2004; VINAGRE et al., 2010; CZAİKOSKI et al., 2015; KLAFKE et al., 2016). Tais benefícios foram atribuídos a bioativos da classe dos compostos fenólicos, flavonoides, óleos essenciais e vitamina C. No entanto, até o momento, não foram encontrados estudos que avaliem o potencial de aplicação biológica dos polissacarídeos do fruto de gabioba, os quais também podem estar relacionados com estas propriedades.

Um dos principais componentes dos frutos são as pectinas, polissacarídeos complexos aos quais têm sido atribuídas diversas propriedades biológicas, como antioxidantes (GAN; LATIFF, 2011; DALONSO; PETKOWICZ, 2012; POPOV et al., 2014; XU et al., 2017; KLOSTERHOFF et al., 2018), anti-inflamatórias (CHEN et al., 2006; MARKOV et al., 2011; LEIVAS; IACOMINI; CORDEIRO, 2016) imunomodulatórias (FERREIRA et al., 2015; NASCIMENTO

et al., 2017b; TAMIELLO et al. 2018) e antitumorais (ZHANG; XU; ZHANG, 2015).

O efeito antitumoral, seja por citotoxicidade direta, imunoestimulação ou sinergia com fármacos convencionais, vêm demonstrando um potencial promissor para o tratamento dos mais diversos tipos de câncer devido ao amplo espectro de propriedades terapêuticas, aliada à baixa toxicidade às células normais (WANG et al., 2015a; RIZWANULLAH et al., 2017; PARK et al., 2017b). Entretanto, grande parte dos avanços nos estudos antitumorais das pectinas são realizados utilizando-se pectinas cítricas comerciais modificadas (MCPs), onde dificilmente é realizada a caracterização estrutural, o que dificulta a compreensão entre a relação estrutura-atividade observada (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013). Além disso, são restritos os estudos da avaliação de efeitos antitumorais com pectinas de fontes vegetais nativas (principalmente frutíferas).

Apesar do progresso na terapia oncológica, o câncer continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo (RIZWANULLAH et al., 2017), demonstrando a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Em relação aos gliomas (tumores malignos originados no sistema nervoso central), ainda é observada uma baixa taxa de sobrevida dos pacientes, além da alta taxa de recorrência.

Portanto, tendo em vista o potencial antitumoral que as pectinas apresentam, que não foram encontrados na literatura estudos relacionados ao efeito citotóxico em linhagens celulares de glioblastoma, além de que nenhuma atividade biológica foi investigada para as pectinas extraídas da gabirola, o estudo desse fruto nativo busca auxiliar na compreensão da bioatividade das pectinas, bem como contribuir para o entendimento dos benefícios à saúde observados para a gabirola, e dessa forma, favorecer a preservação da espécie, incentivando seu cultivo e a utilização do fruto e de seus extratos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Purificar, caracterizar pectinas da polpa de *Campomanesia xanthocarpa* Berg e avaliar os efeitos citotóxicos desses polissacarídeos em modelo de glioblastoma humano

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar extração aquosa a quente (98 °C) das pectinas da polpa de gabioba;
- Purificar a pectina extraída da polpa de gabioba através das técnicas de gelo-degelo, reagente de Fehling e membrana de diálise;
- Caracterizar a estrutura química da pectina purificada provenientes da polpa de gabioba;
- Avaliar a atividade citotóxica das pectinas em linhagens celulares tumorais de glioblastoma (U251-MG) e fibroblastos não tumorais (NIH 3T3) através de ensaios de MTT e cristal violeta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOATIVOS: POTENCIAL DE FRUTOS BRASILEIROS

O Brasil possui uma das mais ricas biodiversidades e a maior diversidade genética vegetal do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas, apresentando grande variedade de metabólitos micro e macromoleculares identificados de diversas partes das plantas, com potencial para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos, suplementos alimentares e agroquímicos (HEINZMANN; BARROS, 2007; JOLY et al., 2011).

Uma fonte importante de conhecimento do uso terapêutico da biodiversidade é a medicina tradicional e popular e, apesar de contribuir significativamente para o avanço da pesquisa e inovação, muitas plantas medicinais da flora nativa ainda são consumidas ou utilizadas para o tratamento de diversos tipos de doenças, com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

As propriedades biológicas e a composição química de frutos comumente encontrados na Europa e da América do Norte têm sido extensivamente descritas na literatura científica, enquanto que os frutos nativos brasileiros, os quais possuem uma variedade incomparável e muito promissora para descoberta de novos compostos e bioativos, representam uma fonte restrita de estudos (SCHRECKINGER et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011; INFANTE et al., 2016).

Os bioativos são compostos considerados como ingredientes não-nutricionais com capacidade de interagir com um ou mais componentes de um organismo vivo, apresentando efeitos biológicos que podem ser potencialmente benéficos para a saúde (GUAADAQUI et al., 2014).

As plantas são fontes importantes de compostos bioativos e estão presentes diariamente na dieta alimentar humana. Recentemente, diversos compostos bioativos vegetais vem sendo investigados quanto ao potencial antioxidante, prebiótico, antitumoral, anti-inflamatório, entre outros (INFANTE et al., 2016; NERI-NUMA et al., 2018). Dentre os mais estudados, estão os metabólitos secundários como flavonoides, carotenoides e ácido ascórbico (vitamina C) (PATIL et al., 2009; ALMEIDA et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Dentre a diversidade de espécies de árvores frutíferas brasileiras, destaca-se a família Myrtaceae que, compreendendo até 145 gêneros e aproximadamente 5970 espécies (THE PLANT LIST – MYRTACEAE, 2013) é considerada uma das famílias mais importantes da flora brasileira devido à alta prevalência de espécies comestíveis e utilizadas na medicina tradicional (FRAUCHES et al., 2016; DONADO-PESTANA et al., 2018).

A família Myrtaceae ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, destacando-se como a mais diversificada em espécies na Mata Atlântica e no cerrado, onde representa de 10% a 15% de diversidade nessas florestas (BARROSO, 1978; HASTON et al., 2009). Os frutos mais conhecidos são a goiaba (*Psidium guajava* L.), a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), o jambo (*Syzygium jambos*) e a jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). Entretanto, apesar da grande variedade de frutos pertencentes a esta família, o conhecimento, utilização e comercialização de muitas espécies ainda é pouco explorado (FERREIRA et al., 2016; HOMCZINSKI, 2017; SERAGLIO et al., 2018).

O camu-camu ou caçari (*Myrciaria dubia*) é um exemplo de fruto nativo pertencente a família Myrtaceae que vem se destacando como potencial fonte de bioativos, a qual foi incluída na classe das “superfrutas” pelas propriedades funcionais apresentadas, além do valor nutritivo, despertando o interesse do mercado da Europa, Estados Unidos da América e Japão em produtos funcionais para saúde e suplementos alimentares (AGUIAR; SOUZA, 2016; NERI-NUMA et al., 2018).

O crescente interesse pelo fruto camu-camu é principalmente devido ao seu conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C). Conhecido como "Rei da Vitamina C", esse fruto apresenta valores de 1230 mg a 7355 mg de ácido ascórbico para cada 100 g de polpa, além de polifenóis, β -caroteno e licopeno, sendo explorada pelo mercado mundial para o desenvolvimento de produtos com fontes naturais de antioxidantes (AGUIAR; SOUZA, 2016; GRIGIO et al., 2017).

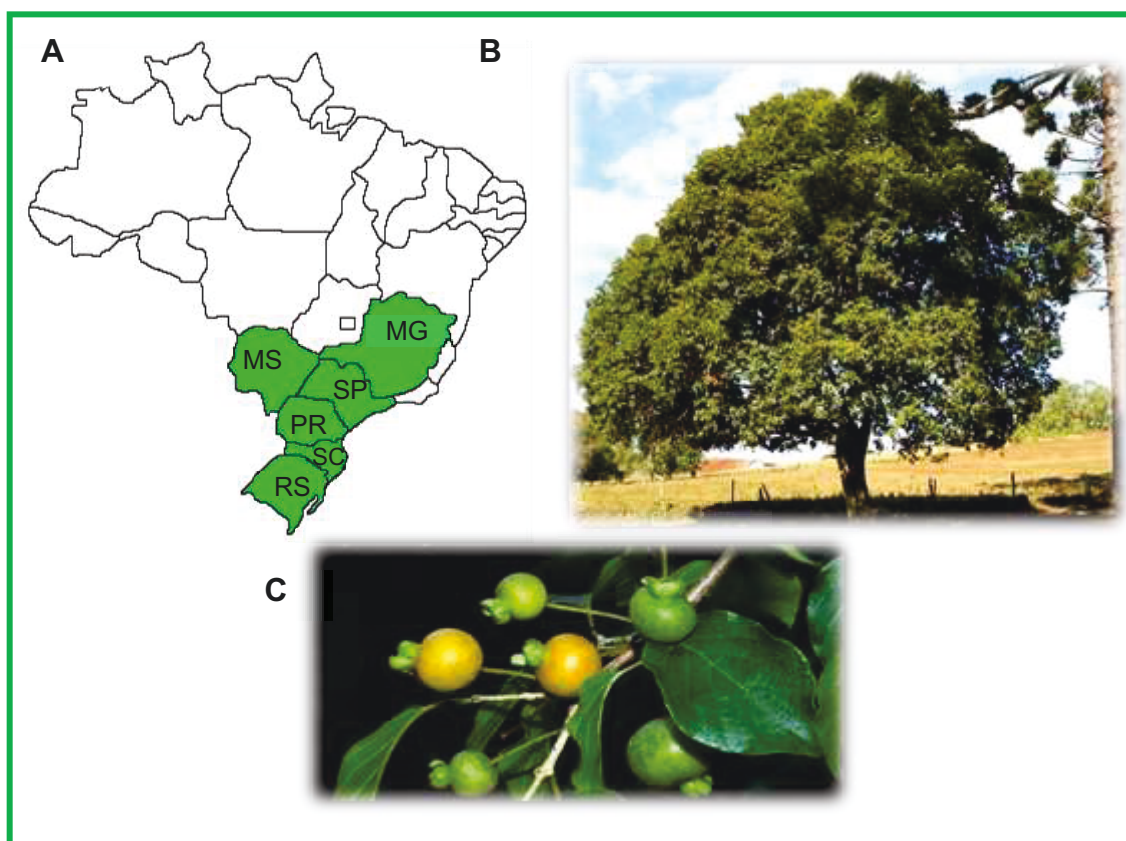
Portanto, na busca por novas biomoléculas, as espécies de frutos nativos brasileiros representam enorme potencial, podendo contribuir para o desenvolvimento econômico sustentável do Brasil, bem como favorecer a preservação dessas espécies.

2.2 *Campomanesia xanthocarpa* Berg

Dentre as diversas plantas nativas da flora brasileira pertencentes a família das Myrtaceae, destaca-se a *Campomanesia xanthocarpa* Berg, popularmente conhecida como gabioba, guabioba, guavirova, guabioba-miúda e guabioba-do-mato, dependendo da região em que é encontrada (BARROSO, 1991; RASEIRA et al., 2004; LORENZI, 2009).

A gabioba, é uma das espécies nativas de árvore frutífera lenhosa utilizada na medicina tradicional que ocorre no Brasil, dos estados de Minas Gerais e São Paulo até o Rio Grande do Sul (FIGURA 1), sendo relatada na literatura a sua presença também no Paraguai, Bolívia e no nordeste da Argentina. Outras sinonímias botânicas dessa espécie são: *C. crenata*, *C. dusenii*, *C. littoralis*, *C. malifolia* e *C. rhombea* (RASEIRA et al., 2004; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011; SARMENTO; SILVA; SILVA, 2012).

FIGURA 1 – GABIROBA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) (A) ESTADOS BRASILEIROS ONDE OCORRE A GABIROBA. (B) GABIROBEIRA. (C) FRUTOS DE GABIROBA VERDES E MADUROS.



FONTE: O autor (2018). Fotos: João A. Bagatini; Sérgio Bordignon.

Os frutos destas árvores apresentam formato globoso de cor verde quando jovens e amarelos quando maduros, sendo doces, suculentos e aromáticos (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011; LORENZI, 2009). Um estudo recente realizado por Ferreira e colaboradores (2016), identificou setenta e nove compostos, dos quais trinta e nove foram detectados pela análise de cromatografia gasosa–olfactometria (GC-O) como aromas olfativos (dentre os principais: linalool e eudesmol), os quais desempenham um papel importante no sabor dos frutos e na aceitabilidade dos consumidores nas análises sensoriais.

O fruto da gabioba é composto por polpa (60%), casca (17%), sementes (16%) e cálice (7%) (SANTOS et al., 2012). O período de colheita dos frutos ocorre entre os meses de novembro e dezembro, dependendo do local geográfico (LORENZI, 2009).

Em relação à composição química dos frutos, estes apresentam alto teor de água (81,4-83,5%); seguidos de carboidratos totais (7,8-10,2%); fibras alimentares (4,1-9,8%); proteínas (1,0-1,1%) e lipídios (0,7-1,9%) (VALLILO et al., 2008; ANDRADE et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

Alguns estudos já identificaram diversos compostos fitoquímicos nas folhas, frutos e sementes da gabioba, como flavonoides, saponinas, taninos, terpenos, carotenos, compostos fenólicos, vitamina A, sais minerais e óleos essenciais, os quais já são conhecidos na literatura por seus potenciais biológicos diversos. Além dessa grande variedade de compostos, a gabioba destaca-se entre os frutos com alto teor (826 mg 100 g⁻¹) de ácido ascórbico (vitamina C) (EMBRAPA FLORESTAS, 2015), sendo comparada à acerola (*Malpighia emarginata*), uma das fontes mais ricas de vitamina C, a qual dependendo da região e da fase de maturação, varia de 243 mg a 1074 mg 100 g⁻¹ (VENDRAMINI; TRUGO, 2000; EMBRAPA FLORESTAS, 2015).

Além disso, a polpa do fruto da gabioba congelada demonstrou estabilidade durante o período de armazenamento, preservando 95% dos teores de flavonoides, 90% do teor de compostos fenólicos totais, 77% do teor de carotenoides e 76% do teor de vitamina C quando armazenadas pelo período de 180 dias (SANTOS et al., 2012).

Apesar do potencial de utilização acima descritos, os frutos de gabioba ainda permanecem pouco explorados, com exceção do consumo *in natura*, bem como para o uso em formulações alimentícias como geleias, doces e sorvetes de forma artesanal.

No âmbito florestal as áreas nativas *C. xanthocarpa* vem sendo preservadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas) visando evitar que esta espécie seja substituída por pastagens e devastada. Essa espécie é considerada estratégica na preservação da Mata Atlântica e dos Cerrados. Rústica e resistente às condições adversas, a guabirobeira se desenvolve bem em terrenos acidentados, com encharcamentos periódicos e de baixa fertilidade natural, ideal para formação de matas ciliares (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Atualmente, devido à devastação das florestas, restringe-se às áreas de preservação permanentes nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

Neste intuito, a Embrapa Florestas iniciou em 2008 projetos de conservação da biodiversidade e valorização dos produtos da floresta com araucária (Rede Conservabio I e Conservabio II) em parceria com as comunidades de agricultores da região de Irati-PR.

Nesta região foram coletados os frutos da gabioba utilizados no presente estudo, o qual está inserido nos projetos “Conservabio II” (2014-2016) e “Gabirofood” (2017-2019), coordenado pela Dra. Rossana Catie Bueno de Godoy (Embrapa Florestas/Colombo-PR), visando estudos com plantas nativas da região Sul do Brasil para conservação e uso sustentável, além da produção de conhecimento científico de maneira integrada, interdisciplinar, multi-institucional e participativa da biodiversidade vegetal desta floresta.

2.2.1 Propriedades medicinais da gabioba

Os extratos de diferentes partes da gabioba (principalmente das folhas) vêm sendo utilizados na medicina tradicional brasileira para o tratamento de diversos tipos de doenças (DICKEL; RATES; RITTER, 2007; KINUPP; BARROS, 2008; LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011).

A infusão das folhas é utilizada principalmente pela população da região Sul do Brasil para tratar disenteria, febre, problemas estomacais, doenças das

vias urinárias, para diminuição dos níveis de colesterol, reumatismo, problemas circulatórios e como agente anti-inflamatório (ALICE et al., 1995; CRUZ; KAPLAN, 2004). Segundo um estudo realizado por Dickel e colaboradores (2007), produtores rurais do estado do Rio Grande do Sul também relataram a utilização da planta para a redução de peso.

De fato, alguns estudos já justificam o uso etnofarmacológico da gabioba. Biavatti e colaboradores (2004) demonstraram que a infusão aquosa de folhas de gabioba induziu uma redução significativa no ganho de peso e na glicemia em ratos alimentados com uma dieta de elevado teor calórico. Esta possível ação relacionada ao índice glicêmico foi estudada posteriormente por Vinagre e colaboradores (2010), onde o tratamento de ratos diabéticos com decocto de folhas de gabioba diminuiu os níveis de glucose sanguínea, inibiu a degradação do glicogênio hepático e preveniu possíveis alterações histopatológicas no pâncreas e no rim.

Alguns estudos em fase clínica também já foram realizados, demonstrando que o tratamento com cápsulas contendo folhas trituradas desta planta reduziu níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) sanguíneo em pacientes hipercolesterolêmicos (KLAFKE et al., 2010; VIECILI et al., 2014) e, além disso, também reduziu os marcadores do estresse oxidativo (Produtos Proteicos de Oxidação Avançada – AOPPs, albumina modificada pela isquemia - IMA e proteína carbonil) (KLAFKE et al., 2010; VIECILI et al., 2014), o biomarcador do processo inflamatório (proteína C reativa) no plasma sanguíneo (VIECILI et al., 2014) e a agregação plaquetária (OTERO et al., 2017).

Dentre as diversas propriedades farmacológicas, a mais investigada até o momento é a atividade antioxidante de extratos (principalmente aquoso e hidroalcoólico) de folhas e de frutos da gabioba. Pereira e colaboradores (2012) avaliaram o potencial antioxidante de três frutos pertencentes a família Myrtaceae: gabioba, araçá amarelo (*Psidium cattleianum* Sabine) e uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess). Nesse estudo, os frutos de gabioba apresentaram a maior atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]. Além disso, a gabioba demonstrou conter maior teor de compostos fenólicos (9 g ácido clorogênico. 100 g⁻¹ de matéria seca) e maior teor de vitamina C (3058 mg. 100 g⁻¹ de matéria seca)

entre as três espécies estudadas, sendo que o conteúdo de vitamina C da gabioba foi 100 vezes maior do que o observado para o araçá amarelo.

Os compostos voláteis da polpa de gabioba, obtidos por extração supercrítica com CO₂, também foram avaliados por Czaikoski e colaboradores (2015), onde apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, em análises referentes ao diâmetro dos halos de inibição, além de apresentarem atividade antioxidante quando avaliadas pelos métodos de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) e de redução fosfomolibdênio. Pereira e colaboradores (2015) por sua vez, sugeriram que, tanto o potencial antioxidante quanto o potencial antimicrobiano estariam associados ao conteúdo polifenólico e carotenoide do extrato acetônico dos frutos de gabioba.

A **tabela 1** resume os estudos com efeitos farmacológicos da gabioba realizados, agrupados de acordo com a parte da planta utilizada para extração (folhas e frutos), apresentando os principais efeitos biológicos observados, bem como os principais compostos químicos identificados.

TABELA 1- PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA GABIROBA (*Campomanesia xanthocarpa*)

(continua)

Parte da planta estudada	Extração	Compostos identificados	Propriedades farmacológicas
¹ Folhas	Infusão aquosa (20 g L ⁻¹), ~100 °C, 10 min	sd	Tratamento crônico (quatro semanas) induziu redução de peso significativo dos ratos, além de redução da glicemia
² Folhas	Decocção aquosa (20 g L ⁻¹), ~100 °C, 10 min	sd	Redução da glicemia , inibição da degradação do glicogênio hepático e prevenção possíveis alterações histopatológicas no pâncreas e nos rins dos ratos diabéticos tratados com o extrato
³ Folhas	Infusão aquosa 1:10 (p/v) ~100 °C	Fenólicos e flavonoides	Efeito hipotensivo de maneira dose-dependente em ratos normotensos. Ação provável sugerida por mediação através do sistema renina-angiotensina, pelo bloqueio do receptor AT1 e pela resposta autonômica simpática
⁴ Folhas	Água (16,7 g L ⁻¹) 37 °C, sob agitação, 30 min	sd	Inibição de trombose, da agregação plaquetária e atividade fibrinolítica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (em ratos). Ausência de citotoxicidade em plaquetas
⁵ Folhas	Água (16,7 g L ⁻¹) 37 °C, sob agitação, 30 min	Fenólicos e flavonoides (rutina, quercetina e kaempferol)	Redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ) e dos níveis plasmáticos de LDL oxidada. Aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória (IL-10). Sem indução de atividade ulcerogênica (em contraste com ácido acetilsalicílico - AAS) dos ratos hipercolesterolêmicos. Resultados superiores ao do AAS
⁶ Folhas	Infusão aquosa a 25% (p/v) ~100 °C	Flavonoides, saponinas e taninos	Atividade mutagênica pelo teste de <i>Salmonella</i> / microssomo
⁷ Folhas	Decocção aquosa (20 g L ⁻¹), ~100 °C, 10 min	sd	Ausência de toxicidade reprodutiva em ratas fêmeas grávidas, sem alteração no desenvolvimento embriofetal. Aumento do peso da placenta e do número de fetos vivos, sugerindo aplicações terapêuticas

(continua)

Parte da planta estudada	Extração	Compostos identificados	Propriedades farmacológicas
⁸ Folhas	- Infusão aquosa (6 e 30 g L ⁻¹) ~100 °C, 10 min - hidrodestilação em extrator <i>Clevenger</i> , ~100 °C, 4 h	Fenólicos, flavonoides e óleos essenciais	Diminuição acentuada na atividade mitótica (atividade antiproliferativa) e atividade genotóxica , com aumento na frequência de aberrações cromossômicas pelo teste de células de cebola (<i>Allium cepa</i> L.) <i>in vivo</i> , quando tratadas com ambos os extratos
⁹ Folhas	- Infusão aquosa (2 g L ⁻¹) ~100 °C, 30 min. - Etanol/água (80:20), 2h em ultrassom, 25°C	Fenólicos e flavonoides	Atividade antioxidante em ambos os extratos (método DPPH)
¹⁰ Folhas	Maceração, 60 °C, até exaustão. Solventes: Etanol P.A., 70%, 50% e água destilada	Flavonoides, antraquinonas, esteroides e/ou triterpenoides, heterosídeos antociânicos, saponinas, taninos, amino grupos	Atividade antioxidante (método DPPH). Resultados melhores do que o da rutina (padrão positivo)
¹¹ Folhas	Percolação com etanol 70%, 25 °C	Flavonoides, saponinas e taninos	Prevenção da ulceração gástrica . Além de ausência de sintomas tóxicos em camundongos em doses até 5 g/kg
¹² Folhas	Maceração (1:5) com metanol, acetato de etila e hexano	Taninos, flavonoides, esteroides e alcaloides	Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas (<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Micrococcus luteus</i>) e Gram negativas (<i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella typhi</i>). Atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i> . Efeito citolítico de 25% em hemácias a 4000 µg mL ⁻¹
¹³ Folhas	Folhas trituradas e encapsuladas (500 e 1000 mg)	sd	Estudo clínico em humanos demonstrou inibição da agregação plaquetária na dose de 1000 mg, por 5 dias e na dose de 500 mg em combinação com baixas doses de AAS (50 mg) em indivíduos saudáveis

(continua)

Parte da planta estudada	Extração	Compostos identificados	Propriedades farmacológicas
¹⁴ Folhas	Folhas trituradas e encapsuladas (250 e 500 mg)	Saponinas, taninos, terpenos e flavonoides	Testes clínicos em humanos demonstraram redução significativa nos níveis de triglicerídeos, LDL e de marcadores do estresse oxidativo (AOPPs) em pacientes hipercolesterolêmicos após 90 dias de tratamento. Efeito próximo ao observado para tratamentos com hipolipemiantes orais, como a rosuvastatina. Potencial antioxidante <i>in vitro</i> (método ABTS) Ausência de efeitos colaterais hematológicos
¹⁵ Folhas	Folhas trituradas e encapsuladas (500, 750 e 1000 mg)	sd	Testes clínicos em humanos demonstraram redução significativa dos níveis de triglicerídeos e de LDL após 90 dias de tratamento, além de redução de marcadores do estresse oxidativo (proteína carbonil) e do processo inflamatório (proteína C reativa) e aumento dos níveis de NOx dos pacientes hipercolesterolêmicos
¹⁶ Frutos	Hidrodestilação em extrator <i>Clevenger</i> , 4 h	Óleos essenciais	Atividade antioxidante (método DPPH)
¹⁷ Frutos	Etanol/Água (4:1) fervente, sob refluxo, 15 min	Fenólicos, vitamina C, flavonoides e carotenoides	Atividade antioxidante (método DPPH e ABTS)
¹⁸ Frutos	Etanol 70% a frio	Flavonoides, saponinas e taninos	Atividade antibacteriana contra as bactérias <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella setubal</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i> . <i>E. faecalis</i> apresentou maior susceptibilidade
¹⁹ Frutos	Fruto inteiro homogeneizado e utilizado	Compostos fenólicos, vitamina C, vitamina A e carotenoides	Maior atividade antioxidante <i>in vitro</i> (método ABTS) entre os 3 frutos testados (gabioba, araquá amarelo e uvaia). Efeito relacionado ao maior teor de compostos fenólicos e de vitamina C encontrado

(conclusão)

Parte da planta estudada	Extração	Compostos identificados	Propriedades farmacológicas
²⁰ Frutos	CO ₂ supercrítico (40 – 80 °C e 15,0 – 25,0 MPa)	23 óleos essenciais. Majoritários: (α, β e γ)-eudesmol, cariofileno (E), (α e β)-sabineno, germacrenoB, δ-cadineno, humuleno e selina-3,7(11)-dieno	Baixa atividade antioxidante (método DPPH), associado ao conteúdo pouco polar extraído. Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i>
²¹ Frutos (sementes)	n-Butano (60 min, 35 °C, 10 bar) e CO ₂ supercrítico (150 min, 40 °C, 25,0 MPa)	Fenólicos, terpenoides e flavonoides. (37 compostos)	Atividade antioxidante (métodos FRAP, DPPH e Deoxiribose) e atividade antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
²² Frutos	Acetona, temperatura ambiente, até completa descoloração. Preparo de nanopartículas	sd	Atividade antibacteriana contra a bactéria <i>Listeria innocua</i> das nanocápsulas com o extrato, enquanto que o extrato livre demonstrou-se sem atividade (sendo associado à baixa solubilidade em água). Já para atividade antioxidante , o extrato livre apresentou o maior potencial pelo método DPPH e atividades equivalentes pelo método ABTS. Além disso, a mesma concentração de extrato livre (275 µg mL ⁻¹) que causou indução de danos oxidativos em células tumorais (HT-29), também promoveu proteção de células normais (CCD-18Co) contra espécies reativas de oxigênio

NOTA: Número à esquerda refere-se à referência bibliográfica. ¹ (BIAVATTI et al., 2004). ² (VINAGRE et al., 2010). ³ (SANT'ANNA et al., 2017). ⁴ (KLAFKE et al., 2012). ⁵ (KLAFKE et al., 2016). ⁶ (FERNANDES; VARGAS, 2003). ⁷ (AUHAREK et al., 2013). ⁸ (PASTORI et al., 2013). ⁹ (KATAOKA; CARDOSO, 2013). ¹⁰ (ABE et al., 2014). ¹¹ (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004). ¹² (DESOTI et al., 2011). ¹³ (OTERO et al., 2017). ¹⁴ (KLAFKE et al., 2010). ¹⁵ (VIECILI et al., 2014). ¹⁶ (MARIN et al., 2008). ¹⁷ (SANTOS et al., 2012). ¹⁸ (SOUZA-MOREIRA et al., 2011). ¹⁹ (PEREIRA et al., 2012). ²⁰ (CZAIKOSKI et al., 2015). ²¹ (CAPELETTO et al., 2016). ²² (PEREIRA et al., 2015). sd: sem descrição. AOPPs: Produtos Proteicos de Oxidação Avançada. IMA: Albumina Modificada pela Isquemia. ABTS: [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]. DPPH: 1,1-difenil-2- picrilhidrazila. FRAP: Poder Antioxidante de Redução do Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). AAS: ácido acetilsalicílico. LDL: lipoproteína de baixa densidade. Nox: metabólitos de óxido nítrico. FONTE: O autor (2018).

Conforme a **tabela 1**, observa-se que as principais classes de bioativos identificados foram compostos fenólicos, flavonoides, óleos essenciais e vitamina C. É possível observar também que maioria dos estudos realizados (cerca de 70%) utilizaram a folha da gabioba como fonte de extração, relatando os mais variados efeitos farmacológicos.

Dentre esses trabalhos, grande parte dos autores realizaram extração aquosa à quente (estudos de 1 a 10 identificados na **tabela 1**) podendo conter polissacarídeos juntamente com outras moléculas, os quais podem ser os responsáveis pelas atividades biológicas observadas ou agirem em sinergismo com outros compostos de baixa massa molar, tendo em vista que os efeitos descritos como: atividade antioxidante (KLOSTERHOFF et al., 2018), anti-inflamatória (MARKOV et al., 2011) e prevenção da ulceração gástrica (CORRÊA-FERREIRA et al., 2018) também já foram relatados para polissacarídeos extraídos com água à quente.

Vale ressaltar que nos estudos de identificação de bioativos e efeitos biológicos descritos na **tabela 1**, a influência dos polissacarídeos nos efeitos biológicos observados não foi investigada.

Além disso, em apenas um estudo, descrito por Pereira e colaboradores (2015), foi verificado o efeito do extrato hidrofóbico do fruto de gabioba em célula tumoral (câncer de cólon, linhagem HT29), onde foi observado indução de danos oxidativos nessas células. Entretanto, os compostos foram extraídos utilizando acetona como solvente, o qual extrai preferencialmente biomoléculas de polaridade semelhante ao solvente, isto é, com caráter hidrofóbico e de baixa massa molar.

2.3 PECTINAS: ESTRUTURA E FUNÇÃO

Os frutos apresentam a parede celular com estrutura altamente organizada, composta de polissacarídeos, proteínas e substâncias aromáticas, como compostos fenólicos. Os polissacarídeos correspondem a aproximadamente 90% da estrutura da parede celular vegetal, e são classificados principalmente em pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA; McCANN, 2000; PAULY; KEEGSTRA, 2010; BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010).

De maneira geral, as pectinas constituem cerca de 40% da parede celular de frutos e vegetais (BRETT e WALDRON, 1990; HOFTE; VOXEUR, 2017), sendo descritas em 1825, quando Henri Braconnot, um farmacêutico e químico francês especialista em extração de componentes ativos de plantas (BRACONNOT, 1825) relatou pela primeira vez o descobrimento de um heteropolissacarídeo com propriedades gelificantes, o qual nomeou como “ácido péctico” (em grego antigo, πηκτικός, que significa espesso) (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013). Desde então, as pectinas têm sido extensivamente estudadas por diferentes áreas da ciência.

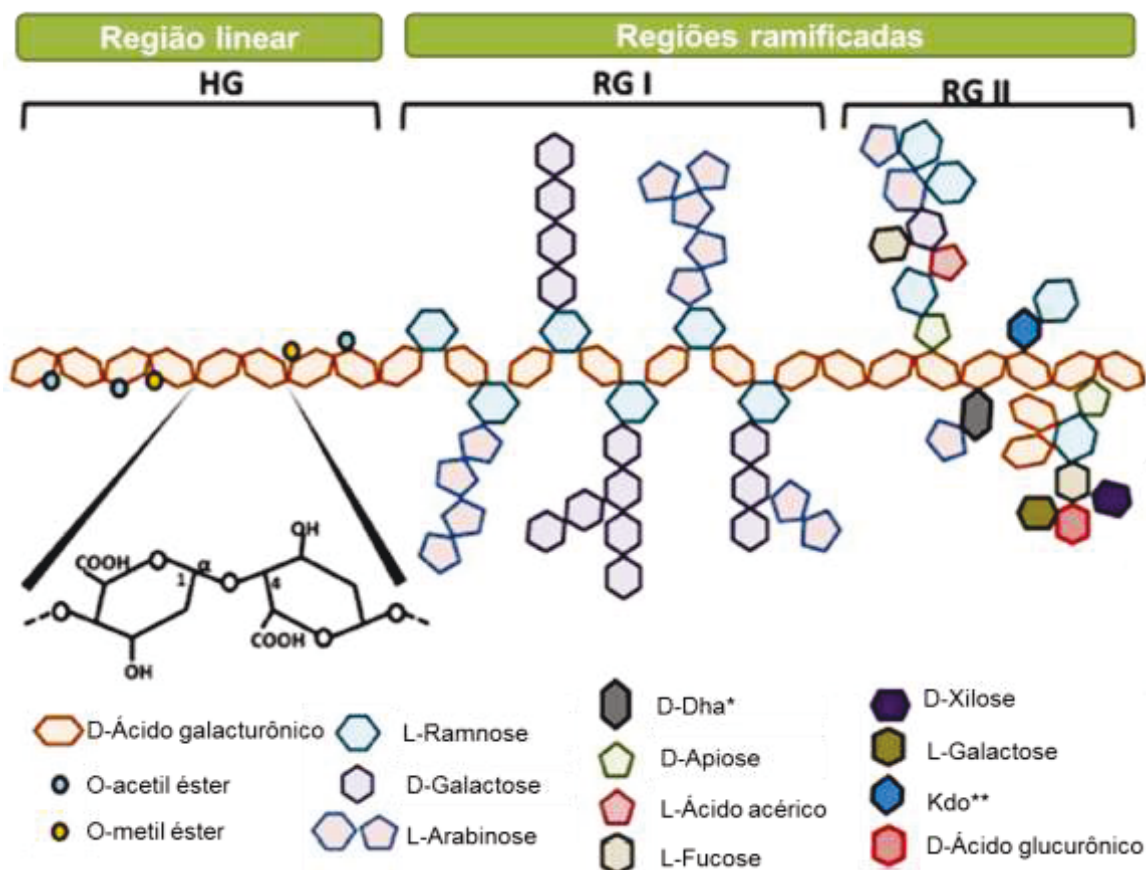
A classe das pectinas compreende polissacarídeos extremamente diversos em sua estrutura fina, que apresentam como característica comum uma cadeia principal formada por ácido galacturônico (CANTERI et al., 2012). As principais funções desempenhadas por esses polissacarídeos nas plantas estão relacionadas com crescimento, morfologia, desenvolvimento, adesão, expansão, porosidade, sinalização, respostas de defesa contra patógenos, retenção de água e formação de géis, influenciando nas propriedades mecânicas da parede celular (CARPITA; McCANN, 2000; MOHNEN, 2008; BENEDETTI et al., 2015).

Segundo Leclere; Cutsem e Michiels (2013), umas das maneiras do patógeno invadir a planta é através da secreção de enzimas do tipo endopoligalacturonases e endopectato liases, degradando as pectinas presentes na parede celular vegetal, as quais geram a liberação de oligossacarídeos (oligogalacturonídeos - OGAs). Esses oligossacarídeos de pectinas são os bioativos que atuam como sinalizadores, iniciando a resposta de defesa da planta, gerando espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 (peróxido de oxigênio) e O_2^- (ânion radical superóxido), além de sinalizarem para a produção de inibidores das proteases.

Do ponto de vista químico, as pectinas formam um grupo de polissacarídeos complexos e, apesar da grande variação de estrutura dependendo do tipo de fonte, da localização na planta e do método de extração, podem ser classificadas em três tipos principais, de acordo com características comuns: homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II), ilustradas na **Figura 2**

(WILLATS et al., 2006; CAFFAL; MOHNEN 2009; LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DAS PECTINAS.



HG: homogalacturonana, RG I: ramnogalacturonana do tipo I, RG II: ramnogalacturonana do tipo II. D-Dha*= ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico. Kdo**= ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico. ADAPTADO DE: Leclere; Cutsem; Michiels (2013).

Homogalacturonanas são homopolímeros de unidades de ácido α -D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo (1→4) nas quais muitos dos grupos ácidos podem estar metil-esterificados em C-6 e também, dependendo do tipo de planta, estarem parcialmente O-acetilados em C-3 ou C-2. Essa região constitui a região linear ou *smooth region* das cadeias de pectinas e, geralmente, correspondem a cerca de 65% da estrutura das pectinas presentes na parede celular (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; YAPO, 2011a).

O grau de metil-esterificação (DE ou DM) das unidades de ácido galacturônico é utilizado para classificar as pectinas, a qual representa a porcentagem de mol de metil-ésteres presentes nas unidades de galA. De acordo com essa definição, as pectinas são classificadas em: pectinas de alto grau de metil-esterificação (HM - *High methoxyl pectin*), quando DE for superior a 50% e pectinas de baixo grau de metil-esterificação (LM - *Low methoxyl pectin*) quando DE for inferior a 50% (VORAGEN et al., 1995; CHAN et al., 2017).

Esse parâmetro afeta as propriedades geleificantes desses polissacarídeos influenciando na tensão superficial e na formação de emulsão. Vale destacar que as condições físico-químicas para a formação dos géis são diferentes: são formados em pH ácido ($\text{pH} < 3,5$) e na presença de co-solutos (como a sacarose) em altas concentrações (60-65%) quando utiliza-se pectinas HM, isto é com DE superior a 50%, enquanto que para as pectinas LM, com DE inferior a 50%, os géis são formados na presença de íons Ca^{2+} e são menos sensíveis às variações de pH que as pectinas HM (STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006; MÜLLER-MAATSCH et al., 2014; CHAN et al., 2017).

Ramnogalacturonanas constituem a região ramificada (*hairy region*) das pectinas. São divididas em dois tipos: ramnogalacturonanas I (RG-I) e ramnogalacturonanas II (RG-II). Ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) representam aproximadamente 20-35% da estrutura das pectinas e são formadas por uma cadeia principal de unidades alternadas de ácido α -D-galacturônico (1 \rightarrow 4) ligadas, e α -L-ramnose (1 \rightarrow 2) ligadas, contendo cadeias laterais de polissacarídeos neutros (YAPO, 2011a; NOREEN et al., 2017)

Essas cadeias laterais podem variar dependendo das fontes de extração. Comumente são formadas por α -L-arabinanas (1 \rightarrow 5) ligadas, β -D-galactanas (1 \rightarrow 4) ligadas, arabinogalactanas do tipo I (AG-I) e arabinogalactanas do tipo II (AG-II) (VORAGEN et al., 2009; NAQASH et al., 2017). Entretanto, podem apresentar outros monossacarídeos ligados nas cadeias laterais como: D-xilose, D-glucose, D-manose, L-fucose e ácido D-glucurônico (VORAGEN et al., 1995).

As arabinogalactanas (AG) podem existir tanto como cadeias laterais de RG-I quanto independentemente das pectinas na parede celular (WU et al., 2005). Segundo Aspinall (1973), as AGs podem ser classificadas em dois

grandes grupos de acordo com as diferenças nas ligações químicas presentes na cadeia principal dessas moléculas.

As arabinogalactanas denominadas do tipo I (AG-I), apresentam cadeia principal de (1→4) β-D-galactanas e podem estar substituídas por arabinose, galactose ou oligossacarídeos de arabinose na posição 3 (CLARKE; ANDERSON; STONE, 1979; STEPHEN, 1983; CANTERI et al., 2012). Enquanto que as do tipo II (AG-II) são compostas por uma cadeia principal formada por (1→3) e (1→6) β-D-galactanas, e as cadeias laterais frequentemente terminam em unidades de arabinose, contudo, outros monossacarídeos podem estar presentes como fucose, ácido glucurônico e ramnose (GASPAR et al., 2001; SEIFERT; ROBERTS, 2007). Além disso, as AG-II geralmente estão associadas as proteínas e, nesse caso, também denominadas arabinogalactanas-proteínas (AGPs) (CANTERI et al., 2012).

Ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II), compreendendo em torno de 10% da estrutura das pectinas, são polissacarídeos pécticos complexos, de menor massa molar, que possuem uma alta proporção de unidades de ramnose ligadas (1→3) e (1→2,3,4) e como unidades terminais (VORAGEN et al., 1995; YAPO, 2011b).

A cadeia principal das RG-II contém de 8 a 10 unidades de ácido α-D-galacturônico com ligação α-(1→4), substituídos em O-2 e/ou O-3 por cadeias laterais heteropoliméricas. As cadeias laterais das RG-II contém cerca de 12 monossacarídeos diferentes e 20 ligações distintas. Os monossacarídeos mais comuns são L-ramnose, L-arabinose, D-galactose e D-glucurônico. Entretanto, podem ocorrer monossacarídeos mais raros como, por exemplo, apiose, ácido acérico, monossacarídeos metilados 2-O-metil-L-fucopirranose e 2-O-metil-D-xilopirranose, Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico) e Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico). As cadeias de RG-II podem formar dímeros através de ligações ésteres entre as unidades de apiose e o elemento boro (B) (ISHII; MATSUNUGA, 1996; VIDAL et al., 2000; VINCKEN et al., 2003; CANTERI et al., 2012).

A produção comercial de pectina atualmente tem como matéria prima principalmente os resíduos industriais da produção de sucos, a partir da casca de frutos cítricos (limão, laranja e lima) e do bagaço de maçã. Em menor quantidade, também há produção a partir do resíduo da polpa de beterraba

após extração de sacarose e de girassol (CIRIMINNA, 2016; EINHORN-STOLL, 2017).

Esses polissacarídeos movimentaram cerca de 850 milhões de dólares no mercado global de hidrocolóides em 2013 (BOMGARDNER, 2013) e cerca de um bilhão de dólares na economia a nível mundial em 2015 (CIRIMINNA, 2016). No Brasil, foram exportadas cerca de 6 mil toneladas de pectinas no valor de 76 milhões de dólares e importadas cerca de 482 toneladas no valor de 6 milhões de dólares, só em 2017 (ALICEWEB, 2018).

A extração comercial das pectinas é realizada usualmente a partir da hidrólise ácida, utilizando-se ácido nítrico, sulfúrico ou clorídrico, nas temperaturas entre 60 °C e 90 °C e variando entre 1 h a 6 h. Entretanto, a maior parte das regiões ramificadas são hidrolisadas, resultando em pectinas na forma de homogalacturonanas lineares com poucas cadeias laterais (WICKER et al., 2014; CIRIMINNA et al, 2015). Além disso, as extrações ácidas também podem induzir a corrosão do equipamento de extração e gerar poluição da água (MUNARIN; TANZI; PETRINI, 2012).

Para contornar essa situação, alternativas vêm sendo propostas, como a extração que emprega aquecimento por micro-ondas, um método mais eficaz de extração pelo maior rendimento em menor tempo (CIRIMINNA et al, 2015). Clark e colaboradores (2013) patentearam um método de extração baseado em micro-ondas, ainda mais avançado, extraíndo pectinas da casca da laranja com apenas uma etapa em um processo “verde”, em temperatura ambiente e sem utilização de ácidos.

Do ponto de vista físico-químico, as pectinas são hidrocolóides solúveis em água, capazes de reter líquidos e formar géis a baixa concentração e, devido à sua alta complexidade e propriedades funcionais, as pectinas têm despertado cada vez mais o interesse industrial para diversas aplicações, sendo amplamente empregadas como estabilizantes em dispersões coloidais e como agente geleificante (CIRIMINNA et al, 2015; NAQASH et al., 2017).

Adicionalmente, são citocompatíveis e biodegradáveis, características que, associadas às propriedades físico-químicas citadas anteriormente, têm destacado esse biopolímero (na forma de hidrogéis, micro e nanopartículas) nas áreas alimentícia, cosmética e mais recentemente na área biomédica, como: engenharia de tecidos, engenharia genética, curativos hidrocolóides,

filmes e revestimentos, entre outras (MUNARIN; TANZI; PETRINI, 2012; VERONOVSKI et al., 2014; MUNARIN et al., 2015).

Em estudo recente de Neves e colaboradores (2015), foi abordado pela primeira vez o uso de hidrogéis de pectina comercial cítrica com formação *in situ* como transportadores de células para estratégias em engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Nesse trabalho, o hidrogel de pectina foi eficaz na promoção de adesão entre células tronco mesenquimais humanas e matriz extracelular. Adicionalmente, essas células permaneceram viáveis e metabolicamente ativas (avaliadas pelo método de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido)) por, no mínimo, 14 dias em cultura embebidas no hidrogel de pectina, demonstrando a capacidade promissora para serem utilizados como biomateriais para liberação de células (*cell delivery*) *in situ*.

2.4 PECTINAS: ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As pectinas, na forma de fibras dietéticas solúveis, apresentam diversos benefícios para a saúde, como: redução do colesterol (GRONDE et al., 2016; NAQASH et al., 2017); diminuição da absorção da glucose (WICKER et al., 2014; CIRIMINNA et al., 2015); além da interação benéfica com a microbiota intestinal, onde são fermentadas a ácidos graxos de cadeia curta, que normalizam a microflora no intestino pela diminuição do pH e previnem o crescimento exacerbado de patógenos (NAQASH et al., 2017; CANTU-JUNGLES et al., 2017).

Na perspectiva farmacêutica, nos últimos anos, as pectinas de diversas fontes têm despertado a atenção de pesquisadores principalmente em relação às suas propriedades antioxidantes (GAN; LATIFF, 2011; DALONSO; PETKOWICZ, 2012; POPOV et al., 2014; XU et al., 2017; KLOSTERHOFF et al., 2018), anti-inflamatórias (CHEN et al., 2006; MARKOV et al., 2011; LEIVAS; IACOMINI; CORDEIRO, 2016) e imunomodulatórias (FERREIRA et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2017b; TAMIELLO et al., 2018). Também já foram descritos efeitos potenciais contra a síndrome da fadiga crônica (WANG et al., 2014), bem como na neuroproteção (FAN et al., 2012; GAO et al., 2018), na proteção gástrica (NASCIMENTO et al., 2017a; CORRÊA-FERREIRA et al., 2018), entre outros.

As atividades antioxidantes das pectinas estão intimamente relacionadas com sua composição monossacarídica, grau de metil esterificação (DE) e viscosidade intrínseca. Segundo Xu e colaboradores (2017), esses polissacarídeos, sendo agentes redutores, podem atuar como doadores de prótons devido a presença de grupamentos hidroxila, eliminando os radicais livres através da formação de um composto mais estável.

Já é amplamente reconhecido que a indução de estresse oxidativo, causado por espécies reativas de oxigênio (EROs), é capaz de gerar danos significativos à estrutura celular e à função biomolecular, as quais desencadeiam, direta ou indiretamente, em uma série de patologias (WANG et al., 2016). Entretanto, relatos sobre a possibilidade de toxicidade de antioxidantes sintéticos, como o BHT (hidroxitolueno butilado) e BHA (hidroxianisol butilado), têm despertado a busca por fontes alternativas naturais (MOURE et al., 2001). Neste contexto, as pectinas ricas em homogalacturonanas têm demonstrado potente ação antioxidante, apesar do mecanismo pelo qual atua ainda ser pouco compreendido (WANG, et al., 2016).

Em relação a atividade anti-inflamatória, o efeito das pectinas (cítrica comercial e de diversas plantas: frutos de arando-vermelho (*Vaccinium vitis-idaea* L.), folhas de bergénia (*Bergenia crassifolia* L.), folhas de lentilha-de-água (*Lemna minor* L.), bermim (*Silene vulgaris* L.), “eelgrass” (*Zostera marina* L.), e bulbo de alho (*Allium sativum* L.)) foram relacionados a estrutura da cadeia linear de homogalacturonana, principalmente com alto grau metil esterificação (HM), sendo capazes de inibir a expressão das enzimas inflamatórias óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em macrófagos ativos (CHEN et al., 2006; MARKOV et al., 2011).

O efeito imunoestimulatório das pectinas parece estar associado ao baixo grau de acetilação e a presença de ramificações, tendo em vista que após o tratamento de desacetilação da pectina extraída da *Centella asiatica* (WANG; LIU; FANG, 2005) e a remoção das regiões lineares por tratamento enzimático com endo-poligalacturonanase da pectina de *Opilia celtidifolia* (TOGOLA et al., 2008) resultaram no aumento dessa atividade. Segundo Ferreira et al., 2015, as atividades imunoestimuladoras dos polissacarídeos podem ser causadas por interações diretas ou indiretas com componentes do

sistema imunológico, os quais podem desencadear diversos eventos celulares e moleculares.

Diversos trabalhos (DALONSO; PETKOWICZ, 2012; BENTO; NOLETO; PETKOWICZ, 2014; FERREIRA et al., 2015; LEIVAS; IACOMINI; CORDEIRO, 2016; NASCIMENTO et al., 2017a; NASCIMENTO et al., 2017b; CORRÊA-FERREIRA et al., 2018; TAMIELLO et al. 2018; KLOSTERHOFF et al., 2018) de investigação das propriedades biológicas das pectinas, vêm sendo desenvolvidos pelo Grupo de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, contribuindo para ampliar o entendimento na elucidação de uma possível relação entre a estrutura química fina dessas moléculas e suas respectivas atividades.

Recentemente, Klosterhoff e colaboradores (2018) relataram o potencial antioxidante intracelular contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em células de fibroblastos murino (linhagem 3T3), pelo método DCFH-DA (2',7'-Diclorofluoresceína diacetato), da pectina com cadeias laterais ricas em arabinanas extraída dos frutos da acerola (*Malpighia emarginata*). Esse estudo foi pioneiro envolvendo este tipo estrutural de pectina e modelo biológico.

Efeito semelhante havia sido relatado por Dalonso e Petkowicz (2012), que caracterizaram e avaliaram a atividade antioxidante (método DPPH e sequestro de radical hidroxila) da fração péctica composta principalmente por HG do pó de guaraná (*Paullinia cupana*), constatando que a fração péctica exibiu efeito antioxidante semelhante ao extrato bruto metanólico (rico em compostos de baixa massa, como compostos fenólicos e metilxantinas).

Corrêa-Ferreira e colaboradores (2018), por sua vez, extraíram e caracterizaram as pectinas (composta por HG, RG-I e AG-II) das partes aéreas da erva-lombrigueira (*Artemisia campestris subsp maritima*), com efeitos significativos na proteção gástrica *in vivo*, apresentado como alternativa para tratamento ou prevenção de úlcera.

As propriedades imunomoduladoras das pectinas dos frutos de jambo (*Syzygium jambos*) foram estudadas por Tamiello e colaboradores (2018). Do extrato aquoso a quente foram fracionados HG, RG-I e AG-II, sendo que a fração contendo AG-II foi avaliada quando a atividade imunomoduladora. Foi

demonstrado a capacidade de indução de secreção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 por macrófagos, bem como a redução de citocinas pró-inflamatórias após indução por LPS (TNF- α e IL-1 β).

Nascimento et al. (2017b) verificaram efeito semelhante para as pectinas nativas (composta por HG com alto grau de DE, RG-I e AG-I) e modificadas por hidrólise ácida parcial (removendo cadeias laterais, grau de metil esterificação e massa molar) do pimentão (*Capsicum annum*), onde ambas apresentaram efeito imunomodulatório, entretanto, as modificações estruturais causadas pela hidrólise ácida desencadearam respostas diferentes na modulação da secreção de citocinas. Os resultados indicaram que o grau de metil esterificação (DE), massa molar e a presença de cadeias laterais com AG-I são importantes fatores estruturais para o efeito imunomodulatório das pectinas.

Esses exemplos demonstram o enorme potencial das pectinas extraídas de diferentes fontes, frente a uma variedade de desafios a serem enfrentados na busca científica da promoção da saúde e tratamento de doenças.

2.4.1 Pectinas: atividade antitumoral

Polissacarídeos extraídos de diferentes fontes como: glucanas provenientes de fungos (ZHANG et al., 2007), heteroramnanas sulfatadas obtidas de algas (ROPELLATO et al., 2015) e pectinas extraídas de plantas (ZHANG; XU; ZHANG, 2015), tem demonstrado potencial promissor como agentes anticancerígenos. Estes polissacarídeos, diferentemente dos fármacos antitumorais convencionais (como temozolomida e doxorubicina, por exemplo), possuem baixa toxicidade. Além disso, são capazes de ativar respostas imunes, entre outros efeitos biológicos que podem melhorar a saúde do paciente em tratamento, atuando como gastroprotetores, antioxidantes e anti-inflamatórios, como relatado anteriormente para as pectinas.

As pectinas mais estudadas em relação ao efeito antitumoral são as isoladas de cascas de frutos cítricos (como limão, lima e laranja), disponíveis comercialmente (as quais são compostas de, pelo menos, 65% de HG), tanto nativas quanto modificadas quimicamente, sendo denominadas MCP (*modified citrus pectin*) ou LCP (*low molecular weight citrus pectin*) após o processo de modificação (MAXWELL et al., 2012).

As modificações químicas nas pectinas são efetuadas principalmente através do tratamento com diferentes pHs, envolvendo um tratamento alcalino (que provoca reações de β -eliminação, despolimerizando a cadeia e desesterificando as regiões de HG), seguido de tratamento ácido (que remove preferencialmente monossacarídeos neutros, na ordem, primeiro arabinose, seguido por galactose e ramnose, levando a despolimerização das regiões ramificadas da pectina) (LECLERE, 2013; MORRIS et al., 2013; ZHANG; XU; ZHANG, 2015). As pectinas também podem ser modificadas por agentes químicos, calor, radiação e/ou tratamento enzimático (ZHANG; XU; ZHANG, 2015).

Essas modificações reduzem a massa molar e enriquecem certos domínios das moléculas consideradas como farmacóforos (estruturas necessárias para a interação biológica que disparam as respostas biológicas). No caso das respostas antitumorais e imunomodulatórias, esses farmacóforos parecem estar presentes na estrutura RG-I das pectinas, principalmente ricas em galactanas e arabinogalactanas (ZHANG; XU; ZHANG, 2015; NAQASH et al., 2017; ZHI et al., 2017).

Dessa forma, já foi relatado que pectinas com alto teor de rhamnogalacturonanas tipo-I (RG-I) presentes na polpa de mamão (*Carica papaya* L.) e nas flores de madressilva japonesa (*Lonicera japonica*), sem necessidade de modificação química, apresentaram atividade antitumoral contra células cancerígenas de cólon e próstata (PRADO et al., 2017), e contra células de adenocarcinoma de pâncreas (LIN et al., 2016), respectivamente.

2.4.1.1 Mecanismo de ação antitumoral das pectinas

As propriedades antitumorais das pectinas são principalmente mediadas através das seguintes abordagens: citotoxicidade direta, imunoestimulação e efeitos sinérgicos em tratamento combinado com fármacos antitumorais convencionais. A citotoxicidade direta se dá pela interferência das pectinas na indução do crescimento e progressão do câncer (YANG et al., 2013). Já são descritos que as pectinas são capazes de induzir apoptose, alteração da progressão do ciclo celular, inibição da adesão, da invasão e da metástase de

vários tipos de tumores, como: adenocarcinoma coloretal, melanoma, câncer de mama, entre outros (MORRIS et al., 2013).

Um dos possíveis mecanismos de ação que vem sendo relatado na literatura para o efeito antitumoral das pectinas seria a capacidade dessa molécula de se ligar a galectina-3 (gal-3), uma proteína pertencente a família das lectinas que apresenta um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD- *carbohydrate recognition domain*), a qual desempenha papel importante em processos tumorigênicos e de progressão do câncer. Portanto, pectinas capazes de antagonizar a ligação de gal-3, impedindo a interação com outras proteínas, seriam capazes de suprimir a metástase e a angiogênese (VLADOIU; LABRIE; ST-PIERRE, 2013; WANG et al., 2016). Vale destacar que o efeito antimetastático é extremamente promissor no tratamento do câncer, tendo em vista que 90% das mortes causadas por essa doença são atribuídas as metástases e que ainda inexistem medicamentos comercialmente distribuídos com efeito antimetastático (PARK et al., 2017b).

Adicionalmente, gal-3 parece ser um importante regulador da apoptose em células cancerígenas através da via intrínseca (mitocondrial). Segundo Glinsky e Raz (2009), gal-3 suprime a apoptose de células tumorais e consequentemente, regula a sensibilidade direta a vários agentes quimioterápicos, como a cisplatina, estaurosporina, etoposídeo, bortezomibe, dexametasona e doxorrubicina. Portanto, a inibição de gal-3 pode ter o potencial de modificar drasticamente a sensibilidade das células tumorais aos quimioterápicos convencionais, suprimindo o efeito anti-apoptótico.

As pectinas cítricas modificadas (MCP), atualmente, são as mais estudadas na busca de bloqueadores de galectina dentre as fontes naturais, se destacando como agente anticancerígeno extremamente promissor. Inclusive, duas MCPs comerciais diferentes e patenteadas: PectaSol-C (ELIAZ; MCCULLOCH, 1999) e GCS-100 (RAZ; PIENTA, 1998) estão sendo incorporadas a testes clínicos. Entretanto, as características estruturais específicas das MCPs responsáveis pela ligação à gal-3, bem como os mecanismos que desencadeiam a atividade anti-metastática ainda não são completamente compreendidos, provavelmente devido a alta complexidade estrutural das pectinas, associada a ausência de caracterização estrutural que

ocorre na maioria dos estudos (MAXWELL et al., 2012; CAGNONI et al., 2016; WANG et al., 2016).

No que diz respeito aos gliomas (tumores malignos originados no sistema nervoso central), há relatos de aumento da expressão tanto de gal-3 quanto de gal-1 (outra proteína da mesma família) durante a progressão maligna desses tipos de tumores (BAILEY et al., 2015). Entretanto, inexistem estudos que tenham observado efeito antitumoral das pectinas em modelos de estudos desses tumores.

Em relação a bioabsorção desses polissacarídeos, sugere-se que os fragmentos de pectina podem ser incorporados por absorção passiva ou captura de células ativas (por exemplo, células epiteliais intestinais). Além disso, há relatos de que algumas glicoproteínas na membrana epitelial poderiam ser reconhecidas por gal-3 e causar endocitose. A absorção passiva pode depender das propriedades físico-químicas, tais como força iônica (polissacarídeo com cargas devido aos grupamentos carboxílicos do GalA), grau de metil esterificação (DE), massa molar e estrutura química, determinando a biodisponibilidade das pectinas. A massa molar das MCPs geralmente variam entre 3 e 60 kDa, o que deve facilitar a sua absorção em relação as cadeias de alta massa molar presente nas pectina sem modificação química (YAN; KATZ, 2010; ZHANG; XU; ZHANG, 2015)

A **tabela 2** resume 21 trabalhos científicos com investigação da atividade antitumoral de pectinas obtidas de diferentes fontes vegetais, bem como as principais informações sobre as características estruturais e atividades biológicas observadas para estes polissacarídeos.

TABELA 2- ATIVIDADE ANTITUMORAL DE PECTINAS EXTRAIDAS DE DIFERENTES FONTES VEGETAIS

(continua)

Fonte	Extração	Monossacarídeos majoritários (ordem decrescente)	Características estruturais	Principais efeitos observados
¹ Pectina cítrica (comercial, Sigma)	sd	sd	DE 30%, 60% e 90%	Inibição da proliferação de células HuCC, HT-29 (carcinoma de cólon) e K562 (leucemia) de maneira dose-dependente pelas pectinas com DE 30% e 60%. Sem inibição de células Raji (linfoma) nas concentrações testadas
² Pectina cítrica (comercial, Sigma P9135)	sd Apenas modificação por aquecimento (pH 4.2, 1 h, 121 °C)	sd	HG (74%) DE: 6,7%	Citotoxicidade em todas as linhagens testadas: A549, A431 (carcinoma epidermóide), HeLa, MDA-MB-231 (câncer de mama) e MCF10A (linhagem normal, epitelial mamária). Efeito atribuído a molécula formada pelo aquecimento de ácido urônico (4,5-dihidroxi-2-ciclopenten-1-ona)
³ Pectina cítrica (comercial, Sigma P9135)	sd Apenas modificação por variação de pH	GalA, Gal, Rha e Ara	Mw: $1,9 \times 10^4$ – $1,0 \times 10^6$ g mol ⁻¹	Inibição de galectina-3 (MIC: 0,5 µg mL ⁻¹)
⁴ Pectina cítrica modificada (comercial) – PectaSol-C e PectaSol	sd	sd	Cadeias curtas levemente ramificadas, ricas em gal Mw: $5,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^4$ g mol ⁻¹ (PectaSol-C) $1,2 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^4$ g mol ⁻¹ (PectaSol)	Ambas causaram citotoxicidade de maneira dose-dependente nas linhagens LNCaP e PC3 (câncer de próstata) e indução apoptose (0,1-1%, 48 h). Sinalização celular via ativação da Caspase-3 e inibição de MAPK
⁵ Pectina cítrica modificada (comercial) - PYKTIN® LCP	sd	sd	Baixa massa molar	Redução da viabilidade celular das linhagens AGS (câncer gástrico) e SW-480 (câncer coloretal) para 76% e 72%, respectivamente, quando tratadas com 5 mg mL ⁻¹ , por 24 h. Alteração do ciclo celular, inibição de GAL-3 e de metástases tumorais <i>in vivo</i> (em ratos)

(continua)

Fonte	Extração	Monossacarídeos majoritários (ordem decrescente)	Características estruturais	Principais efeitos observados
⁶ Casca de madeira de uxi amarelo (<i>Endopleura uchi</i>)	Água fervente, 5 min	Gal, Ara, UA e Rha	Arabinogalactanas Mw: $1,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$	Inibição da proliferação de células HeLa (câncer cervical) em 25% quando tratadas com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 72 h
⁷ Milho (<i>Zea mays</i> L.)	Oxalato de amônio fervente, 1 h, 70 °C, pH 3.5	Gal, Ara, UA, Man, Xyl e Rha	Arabinogalactana Mw: $1,6 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$	Inibição de galectina-3 (MIC: $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) Citotoxicidade (28% e 60% de inibição) em B16F10 (melanoma altamente metastático) quando tratadas com 10 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, por 48 h. Indução de apoptose, inibição da invasão e da adesão celular. Inibição de metástase <i>in vivo</i> (em ratos)
⁸ Resíduo agroindustrial de canola (<i>Brassica napus</i>)	- Água pH 8, 2 h, 30 °C. - EDTA 0,01 M, 60 °C, 2 h, - Protease alcalina (Alkalase), 60 °C, 2h, pH 8 - Pectinase comercial, 45 °C, 15 h	GalA, Gal e Ara	Arabinogalactanas e β -galactanas Mw: $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$	Inibição da proliferação mais acentuada em células MCF-7 (câncer de mama) do que em Caco-2 (câncer coloretal). Fração com melhor afeito: Alkalase, com redução de 80% da proliferação das cels MCF-7 e 60% Caco-2 (10 mg mL^{-1} , 48 h)
⁹ Vagem de quiabo (<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench)	Tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5.2, 70 °C	GalA, Gal e Rha	RG-I (85%), DE:24%, DA: 78%, cadeias de galactanas curtas Mw: $> 1,0 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$	Inibição da proliferação de células B16-F10. Ativação da apoptose
¹⁰ Flores de madressilva japonesa (<i>L. Japonica</i>)	Água fervente, 4h	Ara, Gal, Rha e GalA	RG-I Mw: $5,4 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$	Citotoxicidade (66,7% e 52,1% de inibição) nas linhagens BxPC-3 e PANC-1 (adenocarcinoma de pâncreas), respectivamente, a 1 mg mL^{-1} , 72 h. Sem inibição significativa em células normais (LO2-hepatócitos)

(continua)

Fonte	Extração	Monossacarídeos majoritários (ordem decrescente)	Características estruturais	Principais efeitos observados
¹¹ Folhas de planta fantasma - succulenta (<i>Graptopetalum paraguayense</i> E. Walther)	Água fervente, 2h	Gal, Ara, Rha, Glc e GalA	Arabino-rhamnogalactanas Mw: $2,4 \times 10^3$ g.mol ⁻¹	Inibição da proliferação de células Caco-2. IC ₅₀ = 0,12 mg mL ⁻¹ e atividade imunomodulatória em células BV-2 (micróglia de murino): aumento de 49% de TNF-α a 0,50 mg mL ⁻¹ e 67% de IL-6 a 0,25 mg mL ⁻¹ . Atividade antioxidante pelo método DPPH, ABTS e ânion superóxido
¹² Folhas de chá verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)	Pectinase 0,5%	GalA, Rha, Ara, Gal, KDo e Dha.	RG-II Mw: $9,0 \times 10^3$ g.mol ⁻¹	Inibição de metástase pulmonar das células B16BL6 (melanoma) de maneira dose-dependente <i>in vivo</i> . Efeito antitumoral associado com ativação de macrófagos e células <i>Natural killers</i>
¹³ Polpa de beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	- Solução de HNO ₃ pH 1.7, 70°C, 4h - Isopropanol 60%, pH 12.5, 5°C, 1h -Solução de ácido oxálico, pH 3.5, 70°C, 2h	GalA, Gal, Rha, Ara, Glc, Xyl, GlcA e Fuc	HG, RG-I Mw: $4,19 \times 10^5$ g.mol ⁻¹	Inibição da proliferação em 20,7% das células HT29 na concentração de 1 mg mL ⁻¹ , em 48 h de tratamento. Após remoção enzimática de arabinose houve redução do efeito de inibição, indicando papel importante da arabinose na cadeia lateral para a bioatividade. Sem efeito sobre células DLD-1 (adenocarcinoma coloretal)
¹⁴ Raiz de ginseng-dos-pobres (<i>Codonopsis pilosula</i>)	Água, 90°C, 2h	GalA, Rha, Gal e Ara	HG, RG-I. Gal na cadeia principal. DE: 46,7% Mw: $1,45 \times 10^5$ g.mol ⁻¹	Citotoxicidade em células A549 (adenocarcinoma de pulmão). Inibição de 61,9% em 24 h de tratamento e de 65,4% em 48 h de tratamento, a 400 µg mL ⁻¹
¹⁵ Raízes de ginseng (<i>Panax ginseng</i>) - Comercial	sd	GalA, Glc, Gal, Ara e Rha	RG-I e HG	Sem citotoxicidade em células HeLa, HT-1080 (fibrosarcoma) e L-929 (fibroblastos normais). Entretanto, causou inibição da migração das células HT-1080 (56%) e L-929 (30%) na concentração de 0,5 mg mL ⁻¹ . Além disso, uma diminuição da adesão e do espreadimento celular também foi observado

(continua)

Fonte	Extração	Monossacarídeos majoritários (ordem decrescente)	Características estruturais	Principais efeitos observados
¹⁶ Raízes de ginseng (<i>Panax ginseng</i>) - Comercial	Sd Hidrólise com endo-poligalacturonase	GalA, Gal, Ara e Rha	RG-I e cadeias laterais com AG-I, AG-II, galactanas e arabinanas Mw: $5,0 \times 10^4$ g.mol ⁻¹	Inibição de galectina-3 (MIC= $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$)
¹⁷ Frutos de de ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	Água quente, 90°C, 5 h	Gal, Ara, Glc e Rha	Mw: 1.4×10^5 g.mol ⁻¹	Sem citotoxicidade em células LLC1. Atividade antitumoral associada à atividade imunomodulatória <i>in vivo</i> , inibindo o crescimento do tumor
¹⁸ Casca do fruto de Mikan (<i>Citrus unshiu</i>)	Pectinase de <i>A. niger</i> (24 h a 40°C)	Pelo menos 15 monossacarídeos diferentes	RG-II Mw: $9,0 \times 10^3$ g.mol ⁻¹	82,3% de inibição de metástase das células 26-M3.1 (carcinoma de cólon) em camundongos BALB/c
¹⁹ Casca do fruto decopom (<i>Citrus Hallabong</i>)	Pectinase, 24h, 40°C	GalA, Ara, Rha, Gal, Fuc, GlcA, Xyl, Glc, AceA, Kdo, Api, Dha e Man	RG-II Mw: $9,0 \times 10^3$ g.mol ⁻¹	Sem citotoxicidade em 26-M3.1 e macrófagos. Entretanto, apresentou atividade imunomodulatória , aumentando a produção de IL-6 e IL-12 pelos macrófagos <i>in vitro</i> e acentuando o efeito citotóxico das células NK contra Yac-1 (linfoma). Inibição de metástase pulmonar em camundongos BALB/c
²⁰ Frutos de espinheiro marítimo (<i>Hippophae rhamnoides</i> L)	Água, 90°C, 6h	GalA, Gal, Ara e Glc	HG, DE: 85,16	Sem citotoxicidade em células LLC1 (câncer de pulmão). Atividade antitumoral associada à atividade imunomodulatória <i>in vivo</i> , inibindo o crescimento do tumor após administração intragástrica

(conclusão)

Fonte	Extração	Monossacarídeos majoritários (ordem decrescente)	Características estruturais	Principais efeitos observados
²¹ Polpa de fruto de mamão (<i>Carica papaya</i> L.)	Água, 25°C, 20 min, sob agitação	GalA, Gal, Rha e Ara	RG-I com AG-II, ramificações curtas HG Mw: $1,02 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$	Redução da viabilidade celular e da migração celular. Indução de necroptose a 0,20% nas linhagens HCT116, HT29 (câncer de cólon) e PC3 (câncer de próstata)

NOTA: ¹(BERGMAN et al., 2010). ²(LECLERE et al., 2016). ³(GAO et al., 2012). ⁴(YAN; KATZ, 2010). ⁵(WANG et al, 2016). ⁶(BENTO, NOLETO & PETKOWICZ, 2014). ⁷(JAYARAM, KAPOOR; DHARMESH, 2015). ⁸(COBS-ROSAS et al., 2015). ⁹(VAYSSADE et al., 2010). ¹⁰(LIN et al., 2016). ¹¹(AI et al., 2017). ¹²(PARK et al., 2017b). ¹³(MAXWELL et al., 2015). ¹⁴(YANG et al., 2013). ¹⁵(FAN et al., 2010). ¹⁶(SHI et al., 2017). ¹⁷(WANG et al, 2015b). ¹⁸(PARK et al., 2017a). ¹⁹(LEE et al., 2014). ²⁰(WANG et al, 2015a). ²¹(PRADO et al., 2017). sd: sem descrição. UA: ácido urônico. Gal = galactose. Ara = arabinose. Rha = ramnose. Xyl = xilose. Glc = glucose. Man = manose. GalA= ácido galacturônico. GlcA= ácido glucurônico. Fuc= fucose Kdo= ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico. Dha= ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico. AceA= ácido acérico. Api= apiose (HG) Homogalacturonanas. (RG-I) Ramnogalacturonanas do tipo I. (AG-I) Arabinogalactanas do tipo I. (AG-II) Arabinogalactanas do tipo II (DE) grau de metil esterificação. Mw: massa molar ponderal média. MIC: concentração inibitória mínima. ABTS: [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]. DPPH: 1,1-difenil-2- picrilhidrazila. FONTE: O autor (2018)

Dentre as investigações e os resultados obtidos, vale ressaltar que as pectinas parecem exercer atividade antitumoral frente a diversas linhagens celulares, por diferentes mecanismos, os quais dependem da estrutura química. Grande parte dos estudos associam o potencial anticancerígeno à porção RG-I da estrutura das pectinas, bem como a baixa massa molar. Por exemplo, Vayssade e colaboradores (2010), observaram que as pectinas extraídas das vagens de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) eram compostas principalmente de RG-I (aproximadamente 85% da estrutura), e foram capazes de inibir a proliferação de células B16-F10 (melanoma altamente metastático), além de induzirem a apoptose.

Recentemente, a porção RG-II das pectinas também vem sendo associada a efeitos antitumorais. Entretanto, o mecanismo pelo qual essas estruturas atuam parecem estar mais associado a imunoestimulação e inibição de metástase em vez de citotoxicidade direta (LEE et al., 2014; PARK et al., 2017a; PARK et al., 2017b).

Grande parte dos avanços nos estudos antitumorais das pectinas são realizados utilizando-se pectinas cítricas comerciais modificadas (MCPs) e, além disso, raramente nesses trabalhos há caracterização da estrutura química fina dos polissacarídeos, o que dificulta a compreensão entre a relação estrutura-atividade observada.

Atualmente, ainda são restritos os estudos da avaliação de efeitos antitumorais com pectinas de fontes vegetais nativas (principalmente frutíferas) e inexistem trabalhos que tenham observado o efeito antitumoral de pectinas em células de glioblastoma humano.

Fan e colaboradores (2012) investigaram o efeito das pectinas extraídas das raízes de ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) em células de glioblastoma (linhagem U87) e neuroblastoma (linhagem neuro 2-A e SH-SY5Y), contudo, foi observada ausência de citotoxicidade em todas as células investigadas (método MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), 48 h de tratamento, nas concentrações testadas até 0,5 mg mL⁻¹). Os autores sugerem esse efeito como potencial na aplicação de doenças neurodegenerativas, já que foi observado uma proteção contra danos oxidativos causados por peróxido de hidrogênio.

2.5 GLIOMAS

Nas últimas décadas, a incidência do câncer tem aumentado acentuadamente, sendo considerado uma das principais causas de morte em todo o mundo (RIZWANULLAH et al., 2017; PARK et al, 2017b). No Brasil, segundo os dados mais recentes disponibilizados no início de 2018 pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018), estima-se a ocorrência de cerca de 1,2 milhões de novos casos de câncer no país entre 2018 e 2019. Dentre os tumores malignos, um dos mais letais são os gliomas, os quais são originados no sistema nervoso central (SNC), a partir das células da glia (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; COLQUHOUN, 2017).

O SNC é formado por duas classes celulares: os neurônios, responsáveis por gerar e propagar sinais químicos e elétricos, e as células da glia, cujas principais funções estão relacionadas com o suporte e a nutrição dos neurônios, e papel importante na sinalização celular. As células da glia são classificadas em quatro tipos principais: astrócitos, oligodendrócitos, endimócitos e as células microgliais (RAO, 2003; RASBAND, 2015)

O termo glioma nomeia todos os tumores primários do sistema nervoso central originários das células da glia, portanto, engloba os astrocitomas (tumores derivados dos astrócitos), os oligodendrogliomas (quando derivam dos oligodendrócitos) e os endimomas (provenientes dos endimócitos), além dos gliomas mistos, quando ocorre acometimento de mais de um tipo celular. Dentre os gliomas, os astrocitomas são os mais comuns, correspondendo a cerca de 60-70% dos tumores (RAO, 2003; WOENSEL et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde classifica os astrocitomas em 4 graus de malignidade: grau I (astrocitoma pilocítico, ou seja, com prolongamentos celulares bipolares e longos), benigno, com maior taxa de sobrevida, mais comum em crianças; grau II (astrocitoma de baixo grau), com baixa taxa de crescimento, entretanto, pode se espalhar para tecidos normais e pode se transformar e evoluir para graus maiores; grau III (astrocitoma anaplásico, ou seja, com perda das características morfológicas originais), com alta taxa de proliferação celular e de migração celular, apresenta média de sobrevida de 3,5 anos; grau IV (glioblastoma -

GBM), o mais agressivo dos gliomas e o mais frequente (65%), que, juntamente como os gliomas de grau III, são conhecidos como gliomas malignos (WEN; KESARI, 2008; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; STUPP et al., 2014; JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; ABTA, 2017).

Dentre esses, os glioblastomas (GBM) são tumores primários mais prevalentes do cérebro, com uma taxa de incidência de aproximadamente 3 casos por 100.000 habitantes, sendo que aproximadamente 12.000 novos casos são diagnosticados por ano só nos Estados Unidos (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; POINTER et al., 2014). Além disso, pacientes diagnosticados com GBM possuem taxa de sobrevida média de aproximadamente 15 meses, sendo que apenas 2-5% dos pacientes diagnosticados sobrevivem após 5 anos do diagnóstico. Esse fato está associado à sua malignidade, invasividade e elevado potencial migratório no tecido cerebral adjacente, podendo resultar na criação de focos secundários (OHGAKI; KLEIHUES, 2005; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; JURATLI et al., 2013; STURM et al., 2014).

O tratamento atual dos pacientes com glioblastoma inclui cirurgia para retirada do tumor (nem sempre eficaz devido a invasividade), seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvante (ARBAB et al., 2017). O tratamento quimioterápico padrão é feito com temozolomida, entretanto, pode ocorrer resistência das células cancerígenas, limitando a eficácia do quimioterápico, sendo observada recorrência da doença em mais de 90% dos pacientes (OMURO, 2013; WOENSEL et al., 2013; STUPP et al., 2014; BAILEY et al., 2015). Além disso, os tratamentos convencionais utilizados desencadeiam efeitos colaterais, limitação da dose pela toxicidade, baixa estabilidade *in vivo* e mortalidade por doenças secundárias desencadeadas durante o tratamento (LI et al., 2010; WANG et al., 2015a;)

Portanto, tendo em vista as limitações na terapêutica atualmente utilizados, tratamentos alternativos e/ou complementares se fazem extremamente necessárias para reverter as estatísticas dessa patologia. Recentemente, polissacarídeos de diversas fontes (fungos, algas e vegetais) vêm demonstrando um potencial promissor para o tratamento dos mais diversos tipos de câncer devido ao amplo espectro de

propriedades terapêuticas, aliada à baixa toxicidade às células normais (WANG et al., 2015a; RIZWANULLAH et al., 2017; PARK et al, 2017b).

Em relação ao glioblastoma, estudos com heteroramnanas sulfatadas provenientes de algas tem se mostrado promissores. Ropellato e colaboradores (2015) observaram que as heteroramnanas sulfatadas obtidas da alga verde *Gayralia oxysperma*, foram capazes de diminuir a viabilidade de células da linhagem U87 (glioblastoma humano) de forma concentração-dependente, além de alterarem o ciclo celular.

Porém, apesar do potencial antitumoral das pectinas observados em diferentes linhagens (**Tabela 2**), até o momento, não foram encontrados estudos na literatura que comprovem o efeito em linhagens celulares de glioblastoma. Além disso, nenhuma atividade biológica foi investigada para pectinas extraídas da gabioba. Portanto, a busca de novas fontes de pectinas, com identificação dos parâmetros estruturais, juntamente com o isolamento e o respectivo efeito biológico é de grande importância para o melhor entendimento da bioatividade desses polissacarídeos tão complexos.

3 ARTIGO I

Purification, Chemical Characterization and Cytotoxic Effect on Human Glioblastoma Cells of Pectins from Gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) pulp

Este capítulo é uma reprodução do manuscrito “Purification, chemical characterization and cytotoxic effect on human glioblastoma cells of pectins from gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) pulp.” à ser submetido para o periódico Carbohydrate Polymers.

Impact fator: **4.811**

QualisCapes 2017 / Ciências Biológicas II (CBII): **A1**

Sarah da Costa Amaral¹; Shayla Fernanda Barbieri¹, Andrea Caroline Ruthes^{2,3}, Juliana Müller Bark¹, Nicole Cristine Kerkhoven¹, Elisangela Rodrigues Assunção da Silva¹, Sheila Maria Brochardo Winnischofer¹, Joana Léa Meira Silveira^{1*}

¹*Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Paraná,*

CEP 81.531-980, Curitiba-PR, Brazil

²*Division of Glycoscience, Royal Institute of Technology - KTH, Sweden*

³*Department of Entomology and Nematology, University of Florida, Gulf Coast Research and Education Center (GCREC-UF), Wimauma USA*

*Author to whom correspondence should be addressed: E-mail: jlms12@yahoo.com or jlms12@ufpr.br; Tel.: +55-41-3361-1665.

ABSTRACT

Campomanesia xanthocarpa Berg, popularly known as gabioba, is a Brazilian native specie of Myrtaceae family used in popular medicine to treat different diseases, including hypercholesterolemia and obesity. A crude pectin extract (GW) from gabioba pulp was purified, yielding a homogeneous GWP-FP-S. The monosaccharide composition of GWP-FP-S was predominantly of galacturonic acid (58.8%), arabinose (28.5%), galactose (11.3%) and rhamnose (1.1%). 57.7% of GWP-FP-S chain was attributed to homogalacturonans (HG) and 42.0% to type I rhamnogalacturonans (RG-I). GW and GWP-FP-S were evaluated for their cytotoxic effects. Both fractions induced cytotoxicity (19.55-37.65% of cell viability inhibition) on U251-MG human glioblastoma cells at 10-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 48 h of treatment. These results corroborate the hypothesis that the antitumor effect of pectins is associated to Gal and Ara content of side-chains together with RG-I/HG backbone and report for the first time, the cytotoxic effect of polysaccharides from gabioba pulp on human glioblastoma cells.

Keywords: *Campomanesia xanthocarpa* Berg; Gabioba; Myrtaceae; Pectin; HG; RG-I; NMR analysis; U251-MG glioblastoma cells; Cytotoxicity.

1. INTRODUCTION

A large number of native and exotic fruits around the world continue to be underexploited scientifically and commercially, despite the abundance of species. Brazil harbors the Earth's richest flora, which is characterized by a wide diversity, where several native edible fruits are produced by the species of the Myrtaceae family (Myers, Mittermeier, Mittermeier, Fonseca, & Kent, 2000; Donado-Pestana et al., 2018). The Myrtaceae is a large family, comprising 145 genera and 5970 known species spread across the world (The plant list – Myrtaceae, 2013), considered one of the most important of the Brazilian flora due to high prevalence of edible species or used in traditional medicine (Frauches, Amaral, Largueza, & Teodoro, 2016).

Campomanesia xanthocarpa Berg, popularly known as gabioba, is one of Brazilian native edible specie of the Myrtaceae family (Barroso, 1978), used in folk medicine to treat pathologies such as inflammatory, renal, digestive diseases, obesity and hypercholesterolemia (Alice et al., 1995; Dickel, Rates, & Ritter, 2007).

Scientific studies have been confirmed that the leaves and fruit extracts of *C. xanthocarpa* exhibits a broad spectrum of therapeutic effects, including anti-inflammatory and antioxidant properties (Pereira et al., 2012; Klafke et al., 2016), antimicrobial (Pereira et al., 2015; Czaikoski, Mesomo, Krüger, Queiroga, & Corazza, 2015; Capeletto et al., 2016), antiulcerogenic (Markman, Bacchi, & Kato, 2004), antiplatelet, antithrombotic, and fibrinolytic activities (Klafke et al., 2012; Otero et al., 2017), reduction of cholesterol levels (Klafke et al., 2010; Viecili et al., 2014) and obesity (Biavatti et al., 2004), anti-diabetic (Vinagre et al., 2010) and hypotensive effects (Sant'Anna et al., 2017). However, most of the previously studies focused only on low molar mass compounds and the aforementioned health benefits were attributed to the presence of vitamins (mainly ascorbic acid), flavonoids, volatile oils, carotenoids and phenolic compounds.

The gabioba fruits present around 9% of carbohydrates (Vallilo, Moreno, Oliveira, Lamardo, & Garbelotti, 2008; Andrade, Helm, Mazza, & Mazza, 2012; Santos, Correia, Petkowicz, & Candido, 2012; Barbieri et al., 2017) in which pectins, bioactive heteropolysaccharide that have been attracted attention due to their

therapeutic properties and low toxicity to healthy cells, can be found (Maxwell, Belshaw, Waldron & Morris, 2012; Munarin et al., 2015; Noreen et al., 2017).

Pectins are the second most abundant component of the cell wall of all land plants (Northcote, 1972; Jarvis, Forsyth, & Duncan, 1988; Souto-maior, Reis, Pedreiro, & Cavalcanti, 2010; Noreen et al, 2017). Their structure varies greatly due to the different sources, extraction conditions and developmental stages. Chemically, pectins are defined as an anionic polysaccharide composed of (1, 4)-linked -D-galacturonic acid residues and variety of neutral sugars such as rhamnose, galactose and arabinose. They can be classified into three main types, according to common features: Homogalacturonan (HG), type I Rhamnogalacturonan (RG-I) and type II Rhamnogalacturonan (RG-II) (Carpita & McCann, 2000; Willats, Knox, & Mikkelsen, 2006; Caffall & Mohnen, 2009; Yapo, 2011; Chan, Choo, Young, & Loh, 2017).

HG, also known as “smooth region” of pectin, is a linear homopolymer of (1→4)-linked α -D-galacturonic acid units that are partially methyl-esterified. RG-I, also known as “hairy region” is composed by repeating units of the disaccharide (→2)- α -L-rhamnose-(1→4)- α -D-galacturonic acid-(→1→). About 20-80% of the Rha can be substituted at C-4 by neutral sugar side chains, predominantly of arabinose and galactose (Mohnen, 2008; Voragen, Conen, Verhoef, & Schols, 2009; Yapo, 2011; Chan et al., 2017; Noreen et al., 2017). RG-II appears in minor proportions of pectins and is the most complex structure, composed of an HG backbone containing 12 types of monosaccharides on the side chains and over 20 different linkages (Caffall & Mohnen, 2009).

Biological properties of polysaccharides extracted from Myrtaceae family's fruits have been reported. A pectic arabinogalactan from edible jambo (*Syzygium jambos*) fruits showed immunomodulatory properties (Tamiello, Nascimento, Iacomini, & Cordeiro, 2018); Water-extracted polysaccharides from guava (*Psidium guajava* and *Psidium littorale*) fruits exhibited antioxidant, anti-glycated and α -glucosidase inhibitory activity (Yan, Lee, Kong, & Zhang, 2013; Hua, Zhang, Huang, Yi, & Yan, 2014; Z. Zhang et al., 2016). However, up to now, the bioactivities of pectins extracted from gabiroba fruits (Myrtaceae family) and their antitumor potential remain unexplored.

Pectins are known for their antitumor activities since several decades; however, these activities had been mostly demonstrated from a modified form of commercially available citrus pectin (MCP) (Maxwell et al., 2012; Leclere, Cutsem, & Michiels, 2013) and most antitumor studies have been focused on colon cancer (Zhang, Xu, & Zhang, 2015). Although studies have shown that pectins are effective against a range of cancers including prostate cancer (Prado et al., 2017), breast cancer (Cobs-Rosas, Concha-Olmos, Weinstein-Opppenheimer, & Zúñiga-Hansena, 2015) and melanoma (Vayssade et al., 2010), to our knowledge, there is no report on the antitumor potential of pectins on glioblastoma cells.

Glioblastoma appears as the most frequent and the most lethal primary malignant brain tumor, associated with poor prognosis (Dunn et al., 2012; Bailey et al., 2015). Current therapy includes surgical resection, followed by radiotherapy and/or concomitant adjuvant temozolomide (TMZ) chemotherapy (Arbab et al., 2017). Although modern therapies, over 90% of patients experience tumor recurrence and the average period of survival of patients diagnosed with glioblastoma is still around only 14 months (Tanaka, Louis, Curry, Batchelor, & Dietrich, 2013; Bailey et al., 2015). Therefore, the search for and knowledge of additional therapeutical strategies remains a high priority.

In our previous work, polysaccharides extracted from gabirolba pulp were analyzed evidencing the presence of pectins (Barbieri et al., 2018). Thus, the aim of the present study was to purify the crude pectin extract obtained from gabirolba, to elucidate the chemical structure and evaluate the antitumor potential of the crude pectin extract and the purified pectin fraction, in order to improve the knowledge about structural and bioactive features, since to date, reports about the antitumor potential of pectins from the Myrtaceae family or about the bioactivity of polysaccharides from gabirolba pulp was not found.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Extraction and purification of pectic polysaccharides from gabirolba pulp

Ripe gabirola (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) fruits were collected from a conservation area in Irati-Paraná/Brazil, located at geographic coordinates of 25° 25' South latitude, 50° 36' West longitude, and 25° 17' South latitude, 50° 30' West longitude. A scheme of purification of crude pectic fraction (GW) from gabirola pulp is demonstrated at Figure 1. GW (11.4 g) was obtained by hot water extraction according to Barbieri et al. (2017). Then, freeze-thawing treatment was applied to GW fraction, obtaining a cold-water soluble (GWS) and insoluble (GWP) fractions (Fig. 1). In this procedure, the sample was frozen and then thawed at room temperature (Gorin & Iacomini, 1985). The cold-water insoluble polysaccharide fraction GWP was recovered by centrifugation (3000 rpm, 20 min at 4 °C) and subjected to treatment with Fehling's solution (Jones & Stoodley, 1965). As a result, a soluble fraction named GWP-FS and a Cu²⁺ complex insoluble fraction named GWP-FP were formed.

The GWP-FP fraction was subjected to membrane dialysis (Cellulose 6-8 kDa cut off, Spectrum Labs™) and the precipitation of some of the material could be observed inside the membrane. Thus, the sample was removed from the membrane and centrifuged (3000 rpm, 20 min, 4 °C), obtaining a insoluble fraction GWP-FP-P and the soluble fraction GWP-FP-S, which had its structure characterized and analyzed for the biological activity tests.

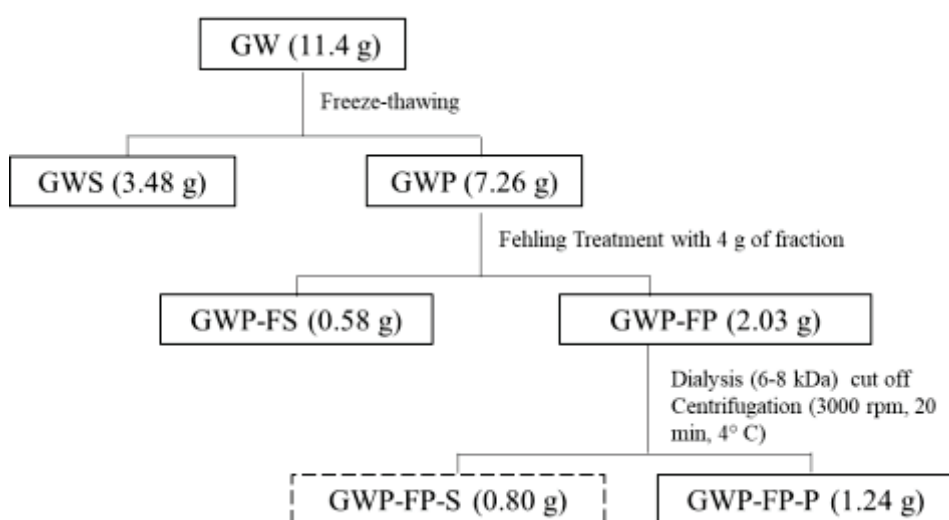


Fig.1. Scheme of purification of fraction GWP-FP-S from gabirola pulp (*Campomanesia xanthocarpa* Berg).

2.2 Monosaccharide composition

Uronic acid content of crude (GW) and purified (GWP-FP-S) fractions obtained from gabioba pulp were quantified by colorimetric *m*-hydroxydiphenyl method, using galacturonic acid as standard (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). The identity of the uronic acid was determined by anion exchange chromatography with pulse amperometric detection (HPAEC-PAD). GWP-FP-S fraction was hydrolyzed with 2 mol L⁻¹ TFA for 8 h at 100 °C, dried and washed with methanol (3x) to remove the acid. The sample (1 mg mL⁻¹) was injected in a Thermo Scientific Dionex ICS-5000 chromatograph (Thermo Fisher Scientific, USA) with CarboPac PA20 column (3 × 150 mm) using gradient of 0.5 mol L⁻¹ NaOH and 1 mol L⁻¹ NaOAc as eluent (Nagel, Sirisakulwat, Carle, & Neidhart, 2014) in N₂ atmosphere in a flow of 0.2 mL min⁻¹ at 24°C. The analysis was carried out in triplicate, the data collected and analyzed using the Chromeleon TM 7.2 Chromatography Data System software.

The neutral monosaccharides components of GWP-FP-S were determined by total acid hydrolysis with 2 mol L⁻¹ TFA for 8 h at 100 °C, followed by conversion to alditol acetates by successive NaBH₄ reduction (Wolfrom & Thompson, 1963a), and acetylation with acetic anhydride (Ac₂O)-pyridine (1:1, v/v, 1 mL) at 100 °C for 30 min (Wolfrom & Thompson, 1963b). The alditol acetates, extracted with CHCl₃, were analyzed in a Thermo Scientific Trace GC Ultra gas chromatograph with a mixture of He, N₂ and compressed air as carrier gas at 1 mL min⁻¹, using a DB-225-MS column (0.32mm internal diameter x 30m x film thickness 0.25µm) programmed from 100 °C to 230 °C at a heating rate of 60 °C min⁻¹. The alditol acetates were identified by their profile, and retention times compared with standards.

2.3 High performance size exclusion chromatography coupled to multidetectors (HPSEC-MALLS-RI)

High performance size exclusion chromatography (HPSEC) coupled with multi-angle laser light scattering - MALLS (DSP -F, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) and refractive index - RI detectors (Waters 2410, Milford, MA, USA) (HPSEC-

MALLS-RI) were used to analyze the homogeneity and average molar mass (M_w) of soluble polysaccharides.

The log plot M_w versus elution time was calculated from Rayleigh/ Debye Gans equation: $Kc / R_\theta = 1 / M_w + 2A_2c$ (Zimm, 1948; Wyatt, 1993), where **K** is the optical constant appropriate for vertically polarized incident light and the polymer solutions used, **c** is the concentration of polymer (g mL^{-1}), **R_θ** is the excess Rayleigh laser light scattering ratio (cm^{-1}), **M_w** is the average molecular mass by weight and **A_2** is the second virial coefficient. The specific refractive index increment (dn/dc), which is defined as the slope of the dependence of refractive index of polymer solution of its concentration, was measured by using a refractive index detector (RI). A dn/dc value of 0.113 mL g^{-1} for GWP-FP-S was calculated and used.

The chromatography was carried out on a Waters system containing four gel permeation columns packed with Ultrahydrogel® 2000, 500, 250 and 120, connected in series, with exclusion limits of 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 and $5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, respectively. The flow rate used was 0.6 mL min^{-1} with 0.1 mol L^{-1} sodium nitrite as the mobile phase and 0.2 g L^{-1} sodium azide as a preservative at a temperature of 25°C . The data was collected and processed by Wyatt Technology ASTRA software, version 4.70.07.

2.4 Protein quantification

Protein content of GW and GWP-FP-S fractions obtained from gabiropa pulp was determined using the Bradford method (Bradford, 1976). A calibration curve of bovine serum albumin was built as standard and the results were expressed g protein/100 g of sample.

2.5 Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

Mono-dimensional (^{13}C - and ^1H -) and bi-dimensional ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC) NMR spectra were acquired at 70°C on a Bruker AVANCE III 400 NMR spectrometer, operating at 9.5 T, and observing ^1H at 400.13 MHz and ^{13}C at 100.61 MHz, equipped with a 5-mm multinuclear inverse detection probe with z-gradient. The

samples were acquired in D₂O with chemical shifts expressed as δ (ppm), using the resonances of -CH₃ groups of acetone (¹H at δ 2.22; ¹³C at δ 30.20) as internal references. All pulse programs were supplied by Bruker.

2.6 Cell culture and treatment with pectic fractions

U251-MG human glioblastoma cell line and NIH 3T3 murine fibroblast cell line were kindly provided by Dr. Mari Cleide Sogayar, Cell and Molecular Therapy Center - NUCEL/NETCEM, Faculty of Medicine, University of São Paulo- FMUSP. Cells were cultured in DMEM high glucose medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicin (Sigma-Aldrich) and were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

For the following experiments GW and GWP-FP-S fractions obtained from gabioba pulp were, separately, dissolved in ultrapure water (5 mg mL⁻¹) and stored at -20 °C, until utilized.

2.7 Cytotoxicity assay

Metabolically active cells were determined by colorimetric MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, assay (Mosmann, 1983) (MTT, Sigma- Aldrich). Briefly, 4x10³ cells/well were seeded in 96-well culture plates for 24 h incubation. Following, cells were treated or not with different concentrations (10, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of GW and GWPFP-S fractions. After 48 h of treatment, GW and GWP-FP-S fractions - containing culture medium was removed, replaced with fresh medium containing 0.5 mg mL⁻¹ MTT and kept for 3 h, protected from light, at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Medium was removed and formazan production on viable cells was solubilized in DMSO. Absorbance was measured by spectrophotometry (Epoch, BioTek, USA) at 545 nm and results were expressed as percentage of control (vehicle used to dissolve the extract - milliQ water), assigned as 100% of metabolically active cells.

Adhered cells were measured by crystal violet staining (Kueng, Silber, & Eppenberger, 1989). Briefly, 4x10³ cells/well were seeded in 96-well culture plates for

24 h incubation. Following, cells were treated or not with different concentrations (10, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of GW and GWPFPS fractions obtained from gabioba pulp. After 48h treatment, GW and GWPFPS fractions -containing culture medium was removed and washed with PBS. Cells were then fixed in methanol for 10 min, stained with crystal violet for 3 min, and then washed with PBS. Afterwards, the stain was diluted in sodium citrate and the amount of stain was quantified in a spectrophotometer (Epoch, BioTek, USA) at 545 nm. Absorbance was proportional to cell number. Results were calculated by comparing absorbance of treated-to-untreated (control) cells, taking control absorbance as 100% adhered cells.

Cell images were obtained using an inverted microscope (Axiovert 40, Carl Zeiss).

2.8 Statistical analysis

Statistical analysis are expressed as mean \pm SD of, at least, three independent experiments in quadruplicate and analysis were performed on GraphPadPrism software version 5.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's. Difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Structural characterization of purified fraction extracted from gabioba pulp

In order to purify the main polysaccharide present in the fraction GW (Fig. 1), recently characterized by Barbieri and co-workers (2018), a freeze-thawing process was done obtaining an insoluble fraction (GWP). Then, GWP fraction was treated with the Fehling's solution and a precipitate fraction (GWP-FP) was obtained. A subsequent treatment by membrane dialysis resulted on a fraction GWP-FP-S.

The Figure 2A presents the HPSEC-RI elution profiles of fractions GW, GWP and GWP-FP-S. The elution profiles for both fractions GW and GWP showed minor and major eluting peaks at retention times of 38 and 48 min, respectively, showing

the heterogeneous profile. Moreover, the elution profile of them finished at 60 min, with a broad and decreasing peak. The GWP-FP-S fraction, differently from fractions GW and GWP, presented a profile with a single elution peak at 51 min. The homogeneous profile of GWP-FP-S, detected by RI, demonstrated that fractionation process adopted was efficient.

HPSEC-MALLS-RI chromatogram and molar mass distribution of GWP-FP-S fraction were performed (Figure 2B). By the light scattering signal (90°) it can be observed major peak between 35 and 45 min, probably from the aggregated fraction, with invisible signal to RI detector, corresponding its (very low) concentration. A minor peak between 45 and 55 min detected by light scattering (90°) is now detected as a major peak observed to refractive index detector, showing a high concentration for GWP-FP-S fraction.

Then, by HPSEC-MALLS-RI chromatogram and molar mass distribution obtained by Rayleigh/ Debye Gans equation, the average molar mass (M_w) was determined to GWP-FP-S of approximately $29,170 \text{ g mol}^{-1}$ (dn/dc 0.113). Usually, unmodified native pectin exhibits a molecular weight in the range of 60,000 to 300,000 g mol^{-1} (Majee, Avlani, Gosh, & Biswas, 2018). However, the low molar mass obtained from purified fraction GWP-FP-S from gabioba pulp could be an advantage, since several studies reported that modified form of commercially available citrus pectin (MCP) with low molecular weight exert better therapeutic benefits compared to large unmodified macromolecules, in addition the improvement on bioabsorption (Morris, Belshaw, Waldron, & Maxwell, 2013; W. Zhang et al., 2015; Naqash, Masoodi, Rather, Wani, & Gani, 2017).

The molecular weight of the purified fraction GWP-FP-S ($29,170 \text{ g mol}^{-1}$), obtained from gabioba pulp, was similar to a modified citrus pectin (MCP) produced by adjusting pH ($30,000 \text{ g mol}^{-1}$), which showed to be a galectin-3 inhibitor (Gao et al., 2012), a carbohydrate recognition domain with ability to modulate important functions for cell survival, migration and metastasis that represent an attractive target to cancer therapy (Vladoiu, Labrie, & St-Pierre, 2014).

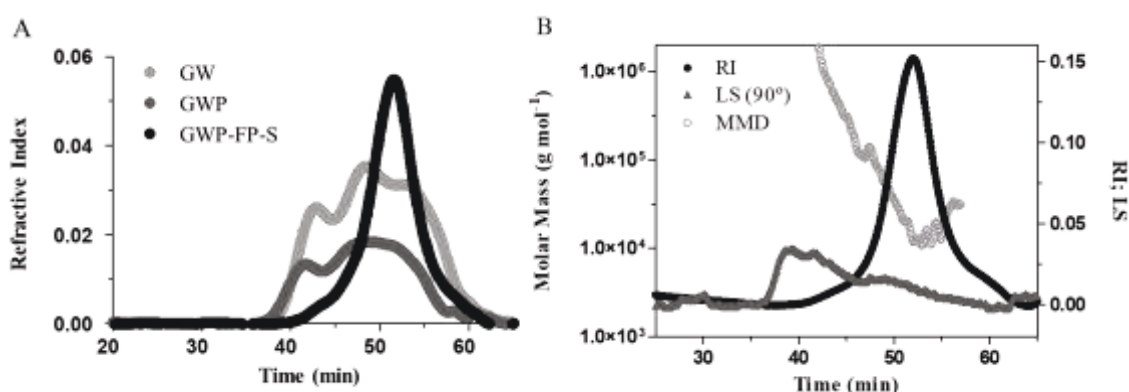


Fig. 2. HPSEC-MALLS-RI elution profile. **(A)** Elution profile by RI to the fractions GW, GWP and GWP-FP-S obtained from the gabioba pulp **(B)** Fraction GWP-FP-S. Molar mass distribution, light scattering (90°) and refractive index (RI).

The monosaccharide composition revealed that GWP-FP-S was predominantly composed by galacturonic acid (GalA, 58.8%), identify by anion exchange chromatography with pulse amperometric detection (HPAEC-PAD) (S1), followed by arabinose (Ara, 28.5%), galactose (Gal, 11.3%) and rhamnose (Rha, 1.1%), suggesting the presence of pectins. When compared to other fruits of the Myrtaceae family, GWP-FP-S showed lower content of GalA than those found for pectins obtained from *Ugni molinae* Turcz (Murta fruits) after extraction with HCl 50 mmol L⁻¹ (Taboada et al., 2010), and *Syzygium jambo* L. (Jambo fruits) also extracted with hot water and treat with Fehling solutions (Tamiello et al., 2018), which presented a GalA content of 77.9% and 90%, respectively. Nevertheless, the content of GalA from GWP-FP-S fraction was similar to that found by Maxwell, et al. (2016) for a modified sugar beet pectin (SBA fraction) that induced apoptosis of colon cancer cells, which presented 52, 5% of GalA.

Table 1. Composition of crude and purified pectin fractions extracted from gabiropa pulp

Fraction	Monosaccharide composition (%) ^a										Protein (%) ^d	
	GalA ^b	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	HG (%) ^c	RG-I (%) ^c		$\frac{(\text{Gal} + \text{Ara})}{\text{Rha}}$
GW	33.5	1.6	0.1	54.5	1.0	tr	7.6	0.9	31.9	65.3	38.8	tr
GWP-FP-S	58.8	1.1	0.1	28.5	0.19	tr	11.3	tr	57.7	42.0	36.2	tr

^a % of peak area of monosaccharide composition relative to the total peak area, determined by GLC.

^b Uronic acids, determined using the m-hydroxybiphenyl method (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973), and identified by HPAEC-PAD.

^c HG= GalA – Rha and RG-I= 2(Rha) + Ara + Gal (M'sakni et al., 2005)

^d Determined by Bradford method (Bradford, 1976).

tr = trace.

GWP-FP-S exhibited an increase on GalA percentage and a decrease in Ara content in comparison to GW, crude fraction extracted from gabiropa pulp, that presented arabinose as the major component (54.5%), followed by galacturonic acid (33.5%), galactose (7.6%) and rhamnose (1.6%), with minor amounts of xylose (1.0%) and glucose (0.9%), observed in our previous work (Barbieri et al., 2018).

According to M'sakni et al. (2006), the relative amount of HG and RG-I domains of pectin may be estimated using the equations:

HG (%) = GalA (%) – Rha (%) and,

RG-I (%) = [GalA (%) – HG(%)] + Rha + Ara + Gal

By applying this relation, 42.0% of GWP-FP-S chain is represented by RG-I, while 57.7% is HG. In addition, to estimate the extension of neutral side chains attached to the RG-I, the ratio (Gal+Ara)/Rha (Houben, Jolie, Fraeye, Loey, & Hendricksc, 2011) was calculated as 36.2.

These results showed a decrease in the RG-I and an increase HG proportions of GWP-FP-S in relation to GW fraction that presented 65.3% of RG-I and 31.9% of HG, as showed by Barbieri et al. (2018). Structural differences in the main chain can be attributed to the Fehling's solution treatment during the process of purification. According to the literature, HG rich chains form a complex with Cu²⁺ and precipitate

after treatment with Fehling's solution (Cantu-Jungles et al., 2014; Nascimento et al., 2015; Leivas, Iacomini, & Cordeiro, 2016; Nascimento, Iacomini, & Cordeiro, 2017). The higher proportion of HG found in the GWP-FP-S fraction can also be evidenced by the amount of galacturonic acid (58.8%) observed in the acid monosaccharide composition (Table 1).

Regarding the protein content, both GW and GWP-FP-S showed no significant amount, when evaluated by Bradford assay.

1D and 2D NMR spectra were analyzed to provide the characterization of detailed chemical structure of the GWP-FP-S fraction. The assignments were in agreement with published data (Petkowicz, Vriesmann, & Williams, 2017; Colodel, Bagatin, Tavares & Petkowicz, 2017; Nascimento, et al., 2017; Klosterhoff et al., 2018).

Chemical structure of GWP-FP-S fraction from the gabioba pulp was investigated by ^{13}C -NMR spectrum (Fig. 3). It showed a typical chemical shift from homogalacturonan observed at δ 99.7 and 70.3 corresponding to C-1 and C-5 of unesterified α -D-GalpA units. The remaining assignments of D-GalpA ring carbons were seen at δ 78.1 (O-substituted C-4/H-4), δ 68.3 (C-3) and δ 68.0 (C-2). The signals of the C-6 of the unesterified α -D-GalpA units could be assigned at δ 171.9. Signals of methyl groups linked to the α -D-GalpA units, previously observed at δ 52.8 ppm in the fraction GW (Barbieri et al., 2018), were not observed for GWP-FP-S because a de-esterification occurred due to the use of alkaline pH in the Fehling treatment. De-esterification was also observed by Nascimento, Iacomini, & Cordeiro (2017) on sweet pepper (*Capsicum annum*) pectin fraction after treatment with Fehling solution.

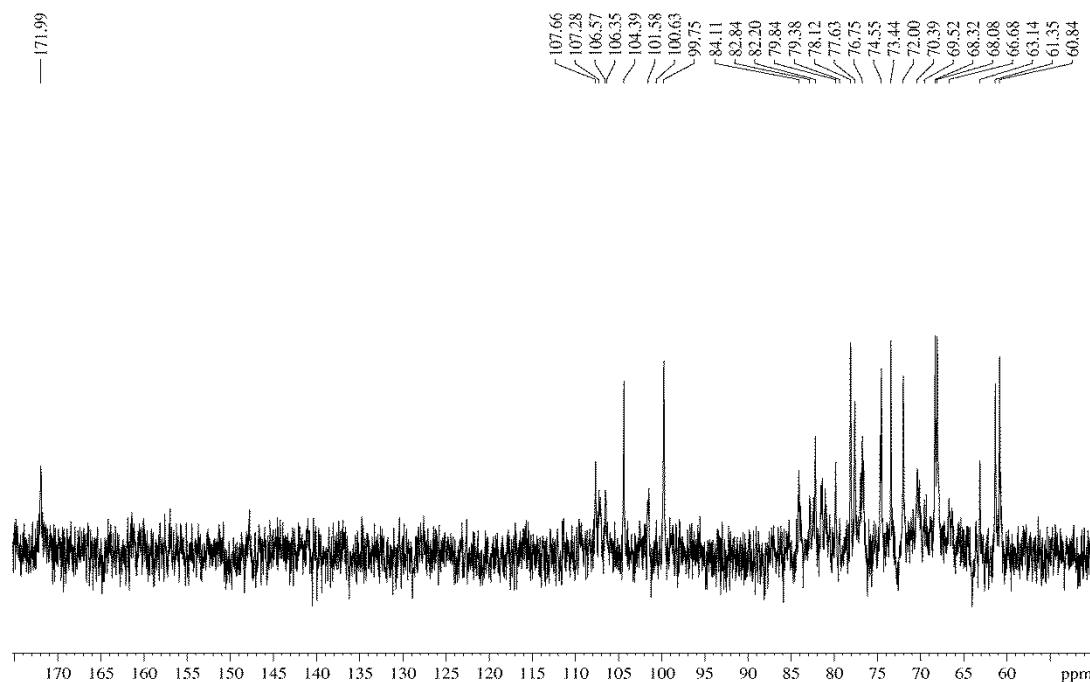


Fig. 3. ^{13}C NMR spectrum of the fraction GWP-FP-S from the pulp of gabiropa fruits, obtained at 70°C in D_2O (chemical shifts are expressed in δ , ppm).

The ^{13}C -NMR spectrum also showed signals at δ 107.6, δ 107.2, 106.5 and 106.3 attributed to α -L-Araf (C-1). Signals for the (1 \rightarrow 4)-linked- β -D-Galp units were showed at δ 104.3 (C-1), δ 72.0 (C-2), δ 73.4 (C-3), δ 77.6 (O-substituted C-4), δ 74.5 (C-5) and δ 60.8 (C-6).

All assignments were confirmed by the analysis of ^1H - ^{13}C heterocorrelated HSQC- NMR spectrum (Fig. 4).

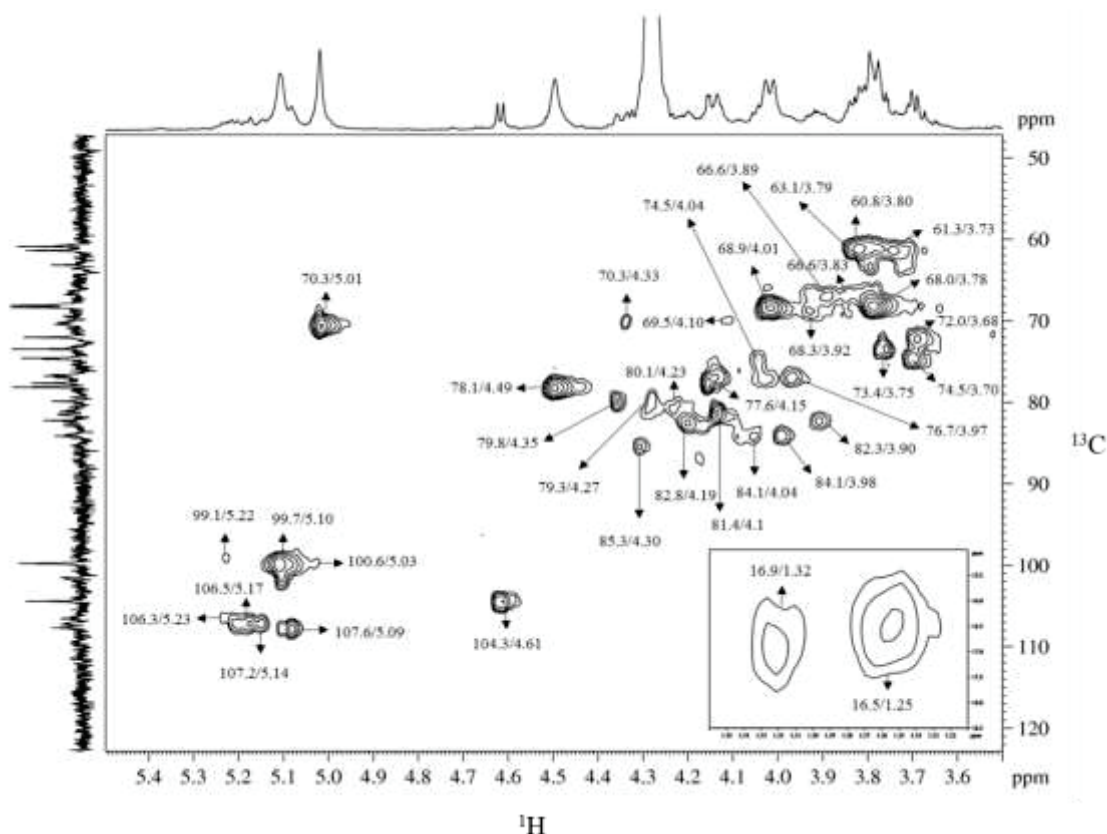


Fig. 4. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC- NMR spectrum of the fraction GWP-FP-S from the pulp of gabioba fruits, obtained at 70 °C in D_2O (chemical shifts are expressed in δ , ppm).

The highest intensity peaks chemical shifts in the spectrum (Fig. 4) were observed at δ C-1/H-1 at δ 99.7/5.10, C-2/H-2 at δ 68.0/3.78, C-3/H-3 at δ 68.3/4.01, C-4/H-4 (O-substituted) at δ 78.1/4.49 and C-5/H-5 at δ 70.3/5.01 from α -D-GalpA (1 \rightarrow 4)-linked units. These signals and the signal corresponded to C-6 of unesterified α -D-GalpA (1 \rightarrow 4)-linked units were observed in ^{13}C -NMR at δ 171.9 (Fig. 3), confirming the presence of a homogalacturonan in GWP-FP-S fraction.

Signals with lower intensity were also observed in the spectrum showing the C-1/H-1 at δ 99.1/5.22 and C-6/H-6 at δ 16.05/1.25 ppm of α -L-Rhap (1 \rightarrow 2)-linked units and 4-O-substituted α -L-Rhap (1 \rightarrow 2)-linked units at δ 16.9/1.32 (C-6/H-6), attributed to type I rhamnogalacturonan (RG-I).

The signals related to the side chain were observed at δ 107.6/5.09 (C-1/H-1), δ 81.4/4.1 (C-2/H-2), δ 82.8/4.19 (C-4/H-4) and 66.6/3.89 (C-5/H-5) attributed to α -L-Araf (1 \rightarrow 5)-linked units. The signals at δ 106.3/5.17 (C1/H1), δ 82.3/3.90 (C-4/H-4)

and δ 66.6/3.83 (C5/H5) were attributed to α -L-Araf (1 \rightarrow 3,5)-linked units and the signals corresponding T- α -L-Araf could be indicated at δ 107.2/5.14 (C-1/H-1), δ 76.7/3.97 (C-3/H-3), δ 84.1/4.04 (C-4/H-4) and 61.3/3.73 (C-5/H-5).

Other signals present in the HSQC spectrum at δ 104.3/4.61 (C-1/H-1), δ 72.0/3.68 (C-2/H-2), δ 73.4/3.75 (C-3/H-3), δ 77.6/4.15 (C-4/H-4), δ 74.5/3.70 (C-5/H-5) and δ 60.8/3.80 (C-6/H-6), were attributed to β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-linked units (Fig. 4). These signals can be attributed to the main chain of type I arabinogalactan (AG-I) arabinans or galactans, which can be substituting the RG-I main chain in the GWP-FP-S fraction.

These results were in agreement with the outcomes of earlier studies where pectins were also obtained by aqueous extraction from other fruits that also belong to the Myrtaceae family, such as Myrtle (*Myrtus communis* L.) (Chidouh, Aouadi, & Heyraud, 2014), Murta (*Ugni molinae* Turcz) (Taboada et al., 2010), Guava (*Psidium guajava* Linn) (Hua et al., 2014) Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) (Moreno, Nascimento, Zielinski, Wosiacki, & Canteri, 2016) and Jambo (*Syzygium jambos* L.) (Tamiello et al., 2018) that presented pectic fractions constituted by HG, RG-I and AG-I as shown by NMR analyzes.

3.2 Cytotoxic effect of crude and purified pectin fractions extracted from gabirolba pulp

The cytotoxic effect of crude (GW) and purified (GWP-FP-S) pectins of gabirolba on human glioblastoma model were evaluated by MTT and crystal violet assays. MTT method involves the reduction of tetrazolium salt to formazan by metabolically active cells (Mosmann, 1983; Berridge, Herst, & Tan, 2005), while crystal violet is an alkaline dye which marks nucleic acids of adhered and fixed cells (Kueng et al., 1989).

U251-MG cells were exposed to different concentrations of GW and GWP-FP-S (10–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 48 h and cell cytotoxicity was then determined (Fig. 5). Both evaluated fractions were able to reduce the number of U251-MG metabolically active cells (detect by MTT assay) (Fig. 5A) and adherent cells (stained by crystal violet assay) (Fig. 5B). These effects were also evidenced by optical microscopy, which

showed that both GW (Fig. 5D) and GWP-FP-S (Fig. 5E) treatments promotes significant changes in U251-MG cell morphology, besides alteration on cell number when compared to vehicle-treated control group (Fig. 5C).

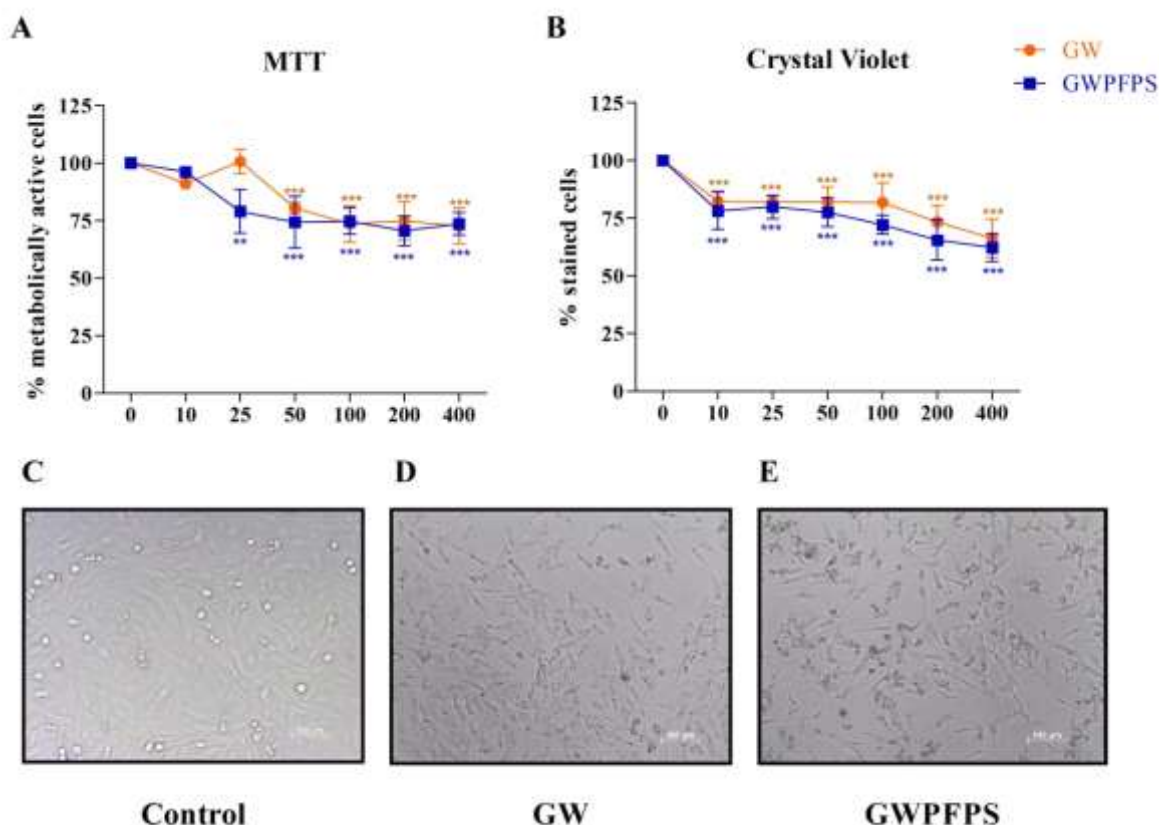


Fig. 5. Cytotoxic effect of GW and GWP-FP-S pectins on glioblastoma cell line. U251-MG cells were treated with GW or GWP-FP-S at different concentrations (10-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 48 h (A) MTT assay (B) Crystal violet assay. The values represent the means \pm SD of percentage of cells compared with the control (data represent at least three independent experiments, each in quadruplicate) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Morphology of U251-MG cells: (C) Control group (cells treated with vehicle). (D) Cells treated with GW at 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (E) Cells treated with GWP-FP-S at 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Magnification 100x.

A decrease in metabolic U251-MG cell activity (19.55%) was observed from 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration of GW, while half concentration (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of GWP-FP-S was necessary to achieve the same effect (inhibition of 20.96% of metabolic human glioblastoma cell activity). However, all concentrations of both GW and GWP-FP-S tested were able to reduce the percentage of adherent cells in equivalent levels (inhibition of 17.66% for GW and 21.79% of GWP-FP-S, at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

It is important to note that cytotoxicity at lower concentrations is one of the most valuable potential for a clinical application, from the pharmacological point of view (Cobs-Rosas et al., 2015).

Interestingly, even in lower concentrations, both fractions diminished the number of viable U251-MG cells. However, these cells seemed to respond to those treatments enhancing metabolic activity, probably in an attempt to maintain their survival. This effect was no longer observed when the treatment with both fractions reached higher concentrations, where percentage of adhered cells correspond to the percentage of metabolically active cells. Specifically, metabolically active cells were reduced by 19.55 – 27.34% for GW and 20.96 – 29.46% for GWP-FP-S, while the number of adherent cells decreased by 17.66 – 33.74% and 21.79 – 37.65% for GW and GWP-FP-S, respectively, at 10–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

In the literature, modified sugar beet pectin reduced by 20.7% the number of viable HT29 colon cancer cells in 48 h at 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Maxwell et al., 2016). Low molecular weight citrus pectin decreased cell viabilities of AGS (gastric cancer) and SW-480 (colorectal cancer) cells by 24% and 28% respectively, at a concentration of 5.0 mg mL^{-1} for 24 h (S. Wang, Li, Lu, & Ling, 2016). On the other hand, Fan et al. (2012) evaluated the effect of *Panax ginseng* (ginseng) pectin on U87 human glioblastoma cells and no cytotoxicity was observed at all tested concentrations (10 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Despite the similar cytotoxic effect between GW and GWP-FP-S (since the cytotoxic effect was not statistically different for these fractions on the same concentration), different chemical structural characteristics between GW and GWP-FP-S may be responsible for their cytotoxicity activity.

The crude GW fraction from gabioba pulp demonstrated to be a heterogeneous fraction with wide range of molar mass distribution, methyl esterification degree (DM) of 60%, composed mostly by RG-I portion (65.3%), presenting high extension of the neutral side chains and high amounts of arabinose (54.5%) (Barbieri et al., 2018). Evidence from literature suggests that the antitumor activity may be related to the RG-I domain, possibly by adopting a conformation that maximizes the availability of neutral sugar side-chains for cellular interaction (Vayssade et al., 2010; Maxwell et al., 2016; Lin et al., 2016; Prado et al., 2017). Besides that, recently, the importance

of arabinose's presence on the structure has been recognized as partial influencer on the pectin's effect in cancer cell lines. Maxwell et al (2016) observed reduction of colon cancer cells proliferation, reaching 7-15% of inhibition, after selective removal of arabinose with α -L-arabinofuranosidase and endo-arabinase on modified sugar beet pectin.

On the other hand, GWP-FP-S was presented as a homogeneous fraction with low molar mass ($29,170 \text{ g mol}^{-1}$), lower proportions of RG-I (42.0%) and de-esterified (occurred due to the employed alkaline pH in the Fehling's treatment). Modified pectins that exhibit lower molecular weight have been reported to produce more profound antitumor activity than native large ones (W. Zhang et al., 2015; Naqash et al., 2017). Methyl esterification degree (DM) also seems to influence cytotoxic effects of pectins. Bergman et al, (2010) observed inhibition of colon cancer cell proliferation for commercial citrus pectins (CP), presenting 30% and 60% DM, while pectins displaying 90% DM showed no significant effect.

In order to evaluate the cytotoxic effect of both fractions on normal cells, NIH 3T3 murine fibroblast cells were exposed to the same treatment conditions with GW and GWP-FP-S ($10 - 400 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ for 48 h), and cytotoxic effect was measured by MTT assay. Both pectins fractions from gabirola showed no cytotoxicity for NIH 3T3 cells after 48 h of treatment at all tested concentrations (Fig. 6). Indeed, pectins have been reported as a biocompatible and non-toxic biopolymer (Munarin et al., 2015; Veronovski, Tkalec, Knez, & Novak, 2014; Chan et al., 2017).

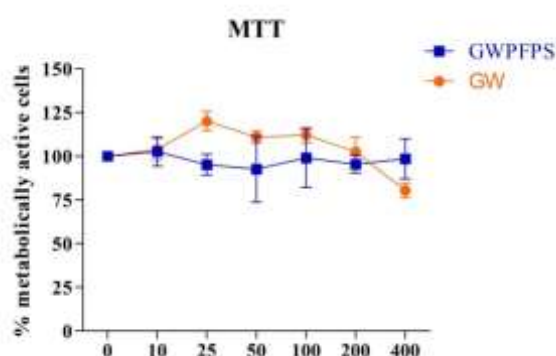


Fig. 6: Cytotoxic effect of GW and GWP-FP-S pectins on normal fibroblast cells. NIH 3T3 cells were treated with GW or GWP-FP-S at different concentrations ($10-400 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) for 48 h and MTT assay were performed. The values represent the means \pm SD of percentage of metabolically active

cells compared with the control (data represent at least three independent experiments, each in quadruplicate) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In contrast, the majority of anticancer agents are toxic to normal cells, generally producing severe side effects, and as a result, many cancer patients die of other secondary diseases, rather than from the cancer itself (Huettemann & Sakka, 2005; Y. Wang, Huang, Sun, & Pan, 2015; Amreddy, Babu, Muralidharan, Munshi, & Ramesh, 2017). Besides that, $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (or $13.7 \mu\text{mol L}^{-1}$) of GWP-FP-S, the highest concentration tested on human glioblastoma model, inhibited 26.5% of metabolically active glioblastoma cells whereas temozolomide (TMZ), standard chemotherapy for glioma patients (Stupp, Brada, Bent, & Tonn, 2014; Bailey et al., 2015), is known to inhibit 24.7% of U251-MG viable cells (also evaluated by MTT assay, on 48 h of treatment) at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Shen, Hu & Zheng, 2014). Interestingly, GWP-FP-S concentration is approximately 7 times lower than the necessary for similar TMZ effect.

The antitumor activity of polysaccharides can be mediated through three main approaches: direct cytotoxicity, immunoenhancement, and synergistic effects in combination with conventional antitumor drugs (Yang et al., 2013). In this context, GW and GWP-FP-S pectins fractions from gabioba pulp could be a good antitumor candidate. The purification and fine characterization are important factors to establish structure-function relationships. Here, for the first time, purified pectin fraction from gabioba pulp is being related to demonstrated cytotoxicity on glioblastoma cell line and this effect can be assigned to a pure pectin that contain HG, RG-I and branched chains composed by arabinose and galactose. Nevertheless, regarding just cytotoxicity purpose, crude pectin GW presented similar effect with the advantage of higher yield, less steps in the process, which means lower cost and time of acquisition.

4. CONCLUSION

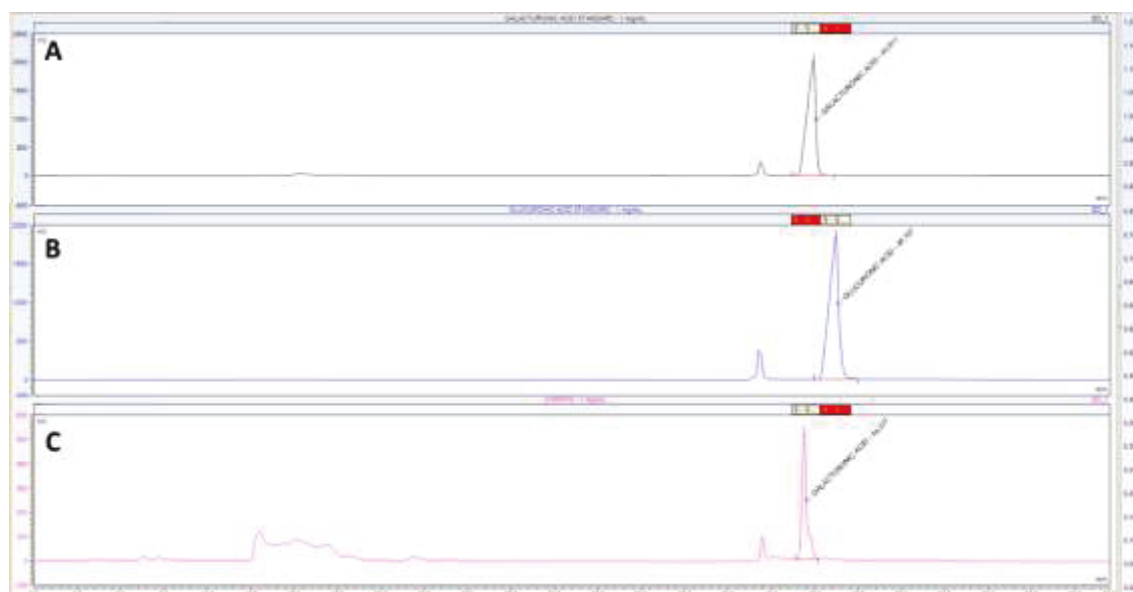
GWP-FP-S pectin was purified from crude (GW) pectin of gabioba pulp and analyzed by monosaccharide composition, homogeneity and 1D and 2D nuclear magnetic resonance. The results indicate the presence of homogalacturonans (HG),

type I rhamnogalacturonans (RG-I) and side chains composed by arabinose and galactose in the RG-I backbone. Crude GW and purified GWP-FP-S pectins of gabirola pulp exhibited cytotoxicity effect against human glioblastoma cells (U251-MG line) and no cytotoxicity to normal (NIH-3T3) cells. This is the first report regarding the anti-cancer potential of polysaccharides extracted from Myrtaceae family's fruits and on the cytotoxicity of these polysaccharides on glioblastoma cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the following Brazilian agencies for financial support: National Research Council of Brazil, the Araucaria Foundation, Nanoglicobiotec and Ministry of Science and Technology/CNPq, and the Federal University of Parana-Brazil. J.L.M.S. is a research member of the CNPq Foundation (n° 476950/2013-9; 308296/2015-0). S.C.A is the beneficiary of a post-graduation scholarship (n° 1646290/2016-9) provided by CAPES and S.F.B. from CNPq Foundation, Brazil (n° 140774/2014-9). The authors would like to NMR Center of UFPR for recording the NMR spectra and Brazilian Agricultural Research Corporation/Embrapa Forestry and Rossana Catie Bueno de Godoy for provide gabirola pulp.

SUPPLEMENTARY FIGURE



Supplementary figure 1 – High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detection (HPAEC-PAD) chromatograms for identification of uronic acids. (A) Chromatogram of galacturonic acid standard (Retention time: 44.9 min); (B) Chromatogram of glucuronic acid standard (Retention time: 46.2 min); (C) Chromatogram of hydrolyzed GWP-FP-S (Retention time: 44.4 min).

REFERENCES

- Alice, C. B., Siqueira, N. C. S., Mentz, L. A., Brasil, E., Silva, G. A. A., & Jose K. F. D. (1995). Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico. (pp. 59-61) Canoas: ULBRA.
- Amreddy, N., Babu, A., Muralidharan, R., Munshi, A., & Ramesh, R. (2017). Polymeric nanoparticle-mediated gene delivery for lung cancer treatment. *Topics in Current Chemistry*, 375, 35-57.
- Arbab, A. S., Rashid, M. H., Angara, K., Borin, T. F., Lin, P. C., Jain, M., & Achyut, B. R. (2017). Major challenges and potential microenvironment-targeted therapies in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2732-2750.
- Andrade, D. R. M., Helm, V. M., Mazza, A. M., & Mazza, M. C. M. (2012). Caracterização por composição nutricional da guabiroba. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 5050-5053.
- Barbieri, S. F., Ruthes, A. C., Petkowicz, C. L. de O., De Godoy, R. C. B., Sassaki, G. L., Santana-Filho, A., & Silveira, J. L. M. (2017). Extraction, purification and structural characterization of a galactoglucomannan from the gabioba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* Berg), Myrtaceae family. *Carbohydrate Polymers* 174, 887-895.
- Barbieri, S. F., Ruthes, A. C., Petkowicz, C. L. de O., Amaral, S. da C. Kerkhoven, N. C., Silva, E. R. A., & Silveira, J. L. M. (2018). Pectin extracted from the pulp of gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): Structural characterization and rheological behavior. *Carbohydrate Polymers*. In Press.
- Barroso, G. M. (1978). Sistemática das Magnoliophytas. In G. M. Barroso (Ed.), *Sistemática de angiospermas do Brasil-Parte II* (pp. 114–126). São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo.
- Bailey, L. A., Jamshidi-Parsian, A., Patel, T., Koonce, N. A., Diekman, A. B., Cifarelli, C. P., Griffin, R. J. (2015). Combined temozolomide and ionizing radiation induces galectin-1 and galectin-3 expression in a model of human glioma. *Tumor Microenvironment and Therapy*, 2(1), 19-31.
- Bergman, M., Djaldetti, M., Salman, H., Bessler, H. (2010). Effect of citrus pectin on malignant cell proliferation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64, 44-47.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- Biavatti, M. W., Farias, C., Curtius, F., Brasil, L. M., Hort, S., Schuster, L., Prado, S. R. T. (2004). Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and

- Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 385-389.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Caffal, K. H. & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344, 1879-1900.
- Cantu-Jungles, T. M., Maria-Ferreira, D., da Silva, L. M., Baggio, C. H., Werner, M. F.P., Iacomini, M., et al. (2014). Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. *Food Chemistry*, 146, 492-499.
- Capeletto, C., Conterato, G., Scapinello, J., Rodrigues, F. S., Copini, M. S., Kuhn, F., Oliveira, J. V. (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO₂ and compressed n-butane. *The Journal of Supercritical Fluids*, 110, 32-38.
- Carpita, N., & McCann, M. (2000) The cell wall. In: Buchaman, B. B., Wilhelm, G., et al (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Rockville American Society of Plant Physiologists*, 52-108.
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., & Loh, X. J. (2017). Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 161, 118-139.
- Chidouh, A., Aouadi, S., & Heyraud, A. (2014). Extraction: fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. *Food Hydrocolloids*, 35, 733-739.
- Cobs-Rosas, M., Concha-Olmos, J., Weinstein-Opppenheimer, C., & Zúñiga-Hansena, M. E. (2015). Assessment of antiproliferative activity of pectic substances obtained by different extraction methods from rapeseed cake on cancer cell lines. *Carbohydrate Polymers*, 117, 923-932.
- Colodel, C., Bagatin, R. M. Das G., Tavares, T., & Petkowicz, C. L. De O. (2017). Cell wall polysaccharides from pulp and peel of cubiu: A pectin-rich fruit. *Carbohydrate Polymers*, 174, 226-234.
- Czaikoski, K., Mesomo, M. C., Krüger, R. L., Queiroga, C. L., & Corazza, M. L. (2015). Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 79-85.

- Dickel, M. L. Rates, S. M. K., & Ritter, M. R. (2007). Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 109 (1), 60-71.
- Donado-Pestana, C. M., Moura, M. H. C., Araujo, R. L. d., Santiago, G. d. L., Barros, H. R. d. M., & Genovese, M. I. (2018). Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. *Current Opinion in Food Science*, InPress: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.001>.
- Dunn, G. P., Rinne, M. L., Wykosky, J., Genovese, G., Quayle, S. N., Dunn, I. F., Hahn, W. C. (2012). Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & Development*, 26(8), 756-784.
- Fan, Y., Sun, C., Gao, X., Wang, F., Li, X., & Kassim, et al. (2012). Neuroprotective effects of ginseng pectin through the activation of ERK/MAPK and Akt survival signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*, 5, 1185-1190.
- Frauches, N. S., Amaral, T. O. d., Largueza, C. B. D., & Teodoro, A. J. (2016). Brazilian *Myrtaceae* Fruits: A review of anticancer proprieties. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 2231-2919.
- Gao, X., Zhi, Y., Zhang, T., Xue, H., Wang, X., Foday, A. D., Zhou, Y. (2012). Analysis of the neutral polysaccharide fraction of MCP and its inhibitory activity on galectin-3. *Glycoconjugate Journal*, 29, 159-165.
- Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (1985). Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. *Carbohydrate Research*, 142(2), 253–267.
- Houben, K., Jolie, R. P., Fraeye, I., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 346 (9), 1105–1111.
- Hua, D., Zhang, D., Huang, B., Yi, P., & Yan, C. (2014). Structural characterization and DPPH[·] radical scavenging activity of a polysaccharide from Guara fruits. *Carbohydrate Polymers*, 103(1), 143–147.
- Huettemann, E., & Sakka, S. G. (2005). Anaesthesia and anticancer chemotherapeutic drugs. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 18(3), 307-314.
- Jarvis M. C., Forsyth, W., & Duncan, H. J. (1988). A Survey of the Pectic Content of Nonlignified Monocot Cell Walls. *Plant Physiology*, 88, 309-314.

- Jones, J. K. N., & Stoodley, R. J. (1965). Fractionation using copper complexes. In R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, & J. N. BeMiller (Eds.), *Methods in carbohydrate chemistry* (pp. 36–38). New York and London: Academic Press.
- Klafke, J. Z., Silva, M. A. d., Panigas, T. F., Belli, K. C., Oliveira, M. F. d., Barichello, M. M., Viecili, P. R. N. (2010). Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 299-305.
- Klafke, J. Z., Silva, M. A. d., Rossato, M. F., Trevisan, G., Walker, C. I. B., Leal, C. A. M., Ferreira, J. (2012). Antiplatelet, antithrombotic, and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8, 10.1155/2012/954748.
- Klafke, J. Z., Pereira, R. L. D., Hirsch, G. E., Parisi, M. M., Porto, F. G., Almeida, A. S. D., Viecili, P. R. N. (2016). Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr-KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *Campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid. *Phytomedicine*, 23(11), 1227-1234.
- Klosterhoff, R. R., Bark, J. M., Glänzel, N. M., Iacomini, M., Martinez, G. R., Winnischofer, S. M. B., & Cordeiro, L. M. C. (2018). Structure and intracellular antioxidant activity of pectic polysaccharide from acerola (*Malpighia emarginata*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 473-480.
- Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*, 182(1), 16-19.
- Leclerc, L., Cutsem, P. V., & Michiels, C. (2013). Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 1-8.
- Leivas, C. L., Iacomini, M., & Cordeiro, L. M. C. (2016). Pectic type II arabinogalactans from starfruit (*Averrhoa carambola* L.). *Food Chemistry*, 199, 252–257.
- Lin, L., Wang, P., Du, Z., Wang, W., Cong, Q., Zheng, C., Shao, C. (2016). Structural elucidation of a pectin from flowers of *Lonicera japonica* and its antipancreatic cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 130-137.
- Majee, S. B., Avlani, D., Gosh, P., & Biswas, G. R. (2018). Therapeutic and pharmaceutical benefits of native and modified plant pectin. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(1), 1-6
- Markman, B. E. O., Bacchi, E. M., & Kato, E. T. M. (2004). Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 55-57.

- Maxwell, E. G., Belshaw, N. J., Waldron, K. W., & Morris, V. J. (2012). Pectin - An emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science & Technology*, 24, 64-73.
- Maxwell, E. G., Morris, V., Waldron, K., & Belshaw, N. (2015). Potato rhamnogalacturonan I reduces colon cancer cell proliferation via a galectin-3 independent mechanism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 74, 66.
- Maxwell, E. G., Colquhoun, I. J., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., Waldron, K. W., Morris, V. J., & Belshaw, N. J. (2016). Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains. *Carbohydrate Polymers*, 136, 923-929.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 266-277.
- Moreno, L., Nascimento, R. F. do, Zielinski, A. A. F., Wosiacki, G., & Canteri, M. H. G. (2016). Extraction and characterization of pectic substances in *Myrciaria cauliflora* (*Jaboticaba sabará*) fruit. *Revista Stricto Sensu*, 1 (1), 1- 11.
- Morris, V. J., Belshaw, N. J., Waldron, K. W., & Maxwell, E. G. (2013). The bioactivity of modified pectin fragments. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 1, 1(1), 21-37.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 63, 55-63.
- Munarin, F., Petrini, M. P., Gentilini, R., Pillai, R. S., Dirè S., & Sglavo, V. M. (2015). Micro- and nano-hydroxyapatite as active reinforcement for soft biocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 199-209.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. d., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403 853–858.
- M'sakni, N. H., Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Cerf, D. L., Rihouey, C., et al. (2006). Composition, structure and solution properties of polysaccharides extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *European Polymer Journal*, 42, 786-795.
- Nagel, A., Sirisakulwat, S., Carle, R., & Neidhart, S. (2014). An acetate hydroxide gradient for the quantitation of the neutral sugar and uronic acid profile of pectins by HPAEC-PAD without postcolumn pH adjustment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2037–2048.
- Nascimento, G. E. do, Corso, C. R., P., Werner, M. F., Baggio, C. H., Iacomini, M., & Cordeiro, L. M. C. (2015). Structure of an arabinogalactan from the edible

- tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. *Carbohydrate Polymers*, 116, 300–306.
- Nascimento, G. E. Do, Iacomini, M., & Cordeiro, L. M. C. (2017). New findings on green sweet pepper (*Capsicum annum*) pectins: Rhamnogalacturonan and type I and II arabinogalactans. *Carbohydrate Polymers*, 171, 292–299.
- Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin-A Review. *Carbohydrate Polymers*, 168, 227–239.
- Noreen, A., Nazlic, Z-I-U., Akrama, J., Rasulb, I., Manshaa, N. Y., Iqbald, R., et al. (2017). Pectins functionalized biomaterials, a new viable approach for biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 254–272.
- Northcote, D. H. (1972). Chemistry of the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology*, 23, 113–132.
- Otero, J. S., Hirsch, G. E., Klafke, J. Z., Porto, F. G., Almeida, A. S. d., Nascimento, S., Viecili, P. R. N. (2017). Inhibitory effect of *Campomanesia xanthocarpa* in platelet aggregation: Comparison and synergism with acetylsalicylic acid. *Thrombosis Research*, 154, 42–49.
- Park, H. R., Hwang, D., Suh, H. J., Yu, K. W., Kim, T. Y., & Shin, K. S. (2017). Antitumor and Antimetastatic Activities of Rhamnogalacturonan-II-Type Polysaccharide Isolated from Mature Leaves of Green Tea via Activation of Macrophages and Natural Killer Cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 179–186.
- Pereira, M. C., Steffens, R. S., Jablonski, A., Hertz, P. F., Rios, A. O., Vizzotto, M., & Flôres, S. H. (2012). Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3061–3067.
- Pereira, M. C., Hill, L. E., Zambiasi, R. C., Mertens-Talcott, S., Talcott, S., & Gomes, C. L. (2015). Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 100–107.
- Petkowicz, C. L. O., Vriesmann, L. C., & Williams, P. A. (2017). Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. *Food Hydrocolloids*, 65, 57–67.
- Prado, S. B. R. d., Ferreira, G. F., Harazono, Y., Shiga, T. M., Raz, A., Carpita, N. C., & Fabi, J. P. (2017). Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. *Scientific Reports*, 7, 1–17.

- Sant'Anna, L. S., Merlugo, L., Ehle, C. S., Limberger, J., Fernandes, M. B., Santos, M. C., Moreira, C. M. (2017). Chemical Composition and Hypotensive Effect of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-11.
- Santos, M. S., Correia, C. H., Petkowicz, C. L. de O., & Cândido, L. M. B. (2012). Evaluation of the technological potencial of gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) fruit. *Journal of Nutritional & Food Sciences*, 2, 2-9.
- Shen, W., Hu, J. A., & Zheng, J. S. (2014). Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. *Journal of International Medical Research*, 42 (1), 164-172.
- Souto-Maior, J. F. A., Reis, A. V., Pedreiro, L. N., & Cavalcanti, O. A. (2010). Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. *Polymer International*, 59, 127-135.
- Stupp, R., Brada, M., Bent, M. J. v. d., & Tonn, J. C. (2014). High-grade glioma: ESMO Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25(3), 93-101.
- Taboada, E., Fisher, P., Jara, R., Zúñiga, E., Gidekel, M., Cabrera, J. C., et al. (2010). Isolation and characterisation of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits. *Food Chemistry*, 123(3), 669-678.
- Tamiello, C. S., Nascimento, G. E. d., Iacomini, M., & Cordeiro, L. M. C. (2018). Arabinogalactan from edible jambo fruit induces different responses on cytokine secretion by THP-1 macrophages in the absence and presence of proinflammatory stimulus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 35-41.
- Tanaka, S., Louis, D. N., Curry, W. T., Batchelor, T. T., & Dietrich, J. (2013). Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? . *Nature Reviews | Clinical Oncology*, 10, 14-26.
- The plant list – Myrtaceae (2013). <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae/>. Accessed in 2017/11/09.
- Vallilo, M. I., Moreno, P. R. H., Oliveira, E. De, Lamardo, L. C. A., & Garbelotti, M. L. (2008). Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 231-237.
- Vayssade, M., Sengkhampan, N., Verhoef, R., Delaigue, C., Goundiam, O., Vigneron, P., Nagel, M. D. (2010). Antiproliferative and Proapoptotic Actions of Okra Pectin on B16F10 Melanoma Cells. *Phytoteraphy Research*, 24, 982-989.

- Veronovski, A., Tkalec, G., Knez, Z., & Novak, Z. (2014). Characterisation of biodegradable pectin aerogels and their potential use as drug carriers. *Carbohydrate Polymers*, 113, 272-278.
- Viecili, P. R. N., Borges, D. O., Kirsten, K., Malheiros, J., Viecili, E., Melo, R. D., Klafke, J. Z. (2014). Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. *Atherosclerosis*, 234, 85-92.
- Vinagre, A. S., Rönnau, A. D., S. R. O., Pereira, S. F.; Silveira, L. U., Wiilland, E. De F., & Suyenaga, E. S. (2010). Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, 46, 169-177.
- Vladoiu, M. C., Labrie, M., & St-Pierre, Y. (2014). Intracellular galectins in cancer cells: Potential new targets for therapy (Review). *International Journal of Oncology*, 44, 1001-1014.
- Voragen, A. G. J., Conen, G.-J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structure chemistry*, 20, 263-275.
- Wang, Y., Huang, M., Sun, R., & Pan, L. (2015). Extraction, characterization of a Ginseng fruits polysaccharide and its immune modulating activities in rats with Lewis lung carcinoma. *Carbohydrate Polymers*, 127, 215-221.
- Wang, S., Li, P., Lu, S. M., & Ling, Z. Q. (2016). Chemoprevention of Low-Molecular-Weight Citrus Pectin (LCP) in Gastrointestinal Cancer Cells. *International Journal of Biological Sciences*, 12(6), 746-756.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (3), 97-104.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride. In Whistler R. L., Wolfrom, M. L & BeMiller J. N., *Methods in carbohydrate chemistry* (pp. 65–68). New York and London: Academic Press Inc.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963b). Acetylation. In Whistler R. L., Wolfrom, M. L & BeMiller J. N., *Methods in carbohydrate chemistry* (pp. 211–215). New York and London: Academic Press Inc.
- Wyatt, P. J. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*, 272, 1–40.

- Yan, C., Lee, J., Kong, F., & Zhang, D. (2013). Anti-glycated activity prediction of polysaccharides from two guava fruits using artificial neural networks. *Carbohydrate Polymers*, 98, 116-121.
- Yang, C., Gou, Y., Chen, J., An, J., Chen, W., & Hu, F. (2013). Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula*. *Carbohydrate Polymers*, 98, 886-895.
- Yapo, B. M. (2011). Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, 86, 373-385.
- Zhang, W., Xu, P., & Zhang, H. (2015). Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 44, 258-271.
- Zhang, Z., Kong, F., Ni, H., Mo, Z., Wan, J. B., Hua, D., & Yan, C. (2016). Structural characterization, α -glucosidase inhibitory and DPPH scavenging activities of polysaccharides from guava. *Carbohydrate Polymers*, 144, 106-114.
- Zimm, B. H. (1948). Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variations of light scattering; preliminary results on polystyrene solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 16(12), 1099-1116.

4 CONCLUSÕES E CONTRIBUIÇÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. Através do fracionamento da fração péctica bruta (GW) utilizando-se as técnicas de congelamento e degelo, tratamento com reagente de Fehling e retirada de impurezas por membrana de diálise, foi possível isolar uma pectina purificada, denominada de fração GWP-FP-S, com massa molar de $29.170 \text{ g mol}^{-1}$;
2. A massa molar da fração purificada GWP-FP-S apresentou-se menor em relação ao observado para as pectinas comerciais, sendo mais vantajosa tendo-se em vista as aplicações biológicas;
3. A fração purificada GWP-FP-S foi caracterizada como uma pectina composta por homogalacturonana (HG) desesterificada e ramnogalacturonana do tipo I (RG-I), apresentando cadeias laterais compostas pelos monossacarídeos arabinose e galactose;
4. O processo de purificação utilizado isolou uma fração péctica (GWP-FP-S) com maior conteúdo de homogalacturonanas do que a sua fração bruta de origem (GW), além disso, após esse processo, observou-se a ocorrência de desesterificação das cadeias de HG;
5. Buscando-se investigar o potencial antitumoral dos polissacarídeos extraídos da polpa de gabioba, as frações pécticas bruta (GW) e purificada (GWP-FP-S) foram utilizadas nos ensaios biológicos de citotoxicidade pelos métodos de MTT e cristal violeta;
6. Quando avaliadas quanto ao efeito citotóxico em células de glioblastoma humano (U251-MG), ambas as frações foram capazes de inibir a viabilidade dessas células (19,55-37,65% de inibição da viabilidade celular), após 48h de tratamento nas concentrações de $10\text{-}400 \mu\text{g mL}^{-1}$;
7. Nas condições testadas, o efeito citotóxico da fração GW não foi estatisticamente diferente do efeito observado para a fração GWP-FP-S. Portanto, visando-se apenas a aplicação citotóxica, a fração GW mostrou-se mais vantajosa tendo em vista o maior rendimento e menores etapas no processo de obtenção, o que acarreta em menor tempo e menor custo para aquisição;

8. Quando avaliadas quanto ao efeito citotóxico em células não tumorais (NIH 3T3), as frações GW e GWP-FP-S não inibiram a viabilidade celular nas mesmas condições testadas em células U251-MG (48h de tratamento nas concentrações de 10-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sugerindo que possa haver uma seletividade desse efeito citotóxico para células com metabolismo alterado.

Os resultados obtidos nesse trabalho de mestrado contribuem para o melhor conhecimento da espécie de gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg), bem como da família Myrtaceae, tendo em vista o enfoque inédito das pectinas extraídas desse fruto como bioativo capaz de modular a resposta biológica. Adicionalmente, o potencial antitumoral foi demonstrado pela primeira vez para pectinas extraídas de frutos da família Myrtaceae. Portanto, esse trabalho contribui para valorização da espécie bem como para sua preservação.

A análise da estrutura fina da pectina extraída e purificada da polpa de gabioba contribui para o melhor entendimento da relação estrutura-atividade biológica das pectinas, uma vez que há escassez de trabalhos científicos que investigam as propriedades antitumorais de pectinas finamente caracterizadas.

O estudo do efeito citotóxico das pectinas em modelo de linhagem de células de glioblastoma humano apresenta uma alternativa em potencial visando o tratamento dessa patologia, a qual atualmente é caracterizada por alta taxa de letalidade e recorrência.

Portanto, para trabalhos futuros, o aprofundamento na investigação dos mecanismos de ação antitumoral das pectinas extraídas da gabioba em células de glioblastoma humano apresenta-se promissor, bem como a comparação desse efeito com outras pectinas com características estruturais diferentes, visando esclarecer a região principal responsável pelo desencadeamento do efeito citotóxico, a qual ainda permanece pouco compreendida.

REFERÊNCIAS

- ABE, S. Y.; SILVA, S. M.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Prospecção fitoquímica, teor de flavonóides totais e capacidade antioxidante de *Campomanesia xanthocarpa* Mart. ex O. Berg (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 11, n. 2, p. 1-14, 2014.
- ABTA. **Glioblastoma and Malignant Astrocytoma**. ASSOCIATION, A. B. T. 2017
- AGUIAR, J. P. L.; SOUZA, F. das C. do A. Camu-Camu super fruit (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh) at different maturity stages. *African Journal of Agricultural Research*. n. 28, v.11, p. 2519-2523, 2016
- AI, L.; CHUNG, Y. C.; JENG, K. C. G.; LAI, P. F. H.; YEH, S. C.; LEE, K. C.; LIN, S. Y.; XIA, Y.; WANG, G.; CUI, S. W. Antioxidant hydrocolloids from herb *Graptopetalum paraguayense* leaves show anti-colon cancer cells and anti-neuroinflammatory potentials. **Food Hydrocolloids**. v. 73, p. 51-59, 2017.
- ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; BRASIL, E.; SILVA, G. A. A.; JOSE K. F. D. **Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico**. Canoas: ULBRA. p. 59-61, 1995.
- ALICE WEB. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br//consulta-ncm/consultar>>. Acesso em: 06 dez. 2017.
- ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**. v. 44, p. 2155-2159, 2011.
- AMREDDY, N.; BABU, A.; MURALIDHARAN, R.; MUNSHI, A.; RAMESH, R. Polymeric nanoparticle-mediated gene delivery for lung cancer treatment. **Topics in Current Chemistry**. v. 375, p. 35-57, 2017.
- ANDRADE, D. R. M.; HELM, V. M.; MAZZA, A. M.; MAZZA, M. C. M. Caracterização por composição nutricional da guabiroba. **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura**, p. 5050-5053, 2012.
- ARBAB, A. S.; RASHID, M. H.; ANGARA, K.; ET AL., BORIN, T. F.; LIN, P-C.; JAIN, M.; ACHYUT, B. R. Major Challenges and Potential Microenvironment-Targeted Therapies in Glioblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**. v.18, n.12, p. 2732-2751, 2017
- ASPINALL, G. O. Carbohydrate polymers of plant cell walls. In: LOEWUS, F. (Ed.). **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1973. p.95-115.

AUHAREK, S. A.; VIEIRA, M. C.; CARDOSO, C. A. L.; OLIVEIRA, R. J.; CUNHA-LAURA, A. L. Reproductive toxicity of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) in female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 148, p. 341-343, 2013.

BARBIERI, S. F.; RUTHES, A. C.; PETKOWICZ, C. L. de O.; DE GODOY, R. C. B.; SASSAKI, G. L.; SANTANA-FILHO, A.; SILVEIRA, J. L. M. Extraction, purification and structural characterization of a galactoglucomannan from the gabioba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* Berg), Myrtaceae family. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 887-895, 2017.

BARBIERI, S. F., RUTHES, A. C., PETKOWICZ, C. L. DE O., AMARAL, S. DA C. KERKHOVEN, N. C., SILVA, E. R. A., & SILVEIRA, J. L. M. Pectin extracted from the pulp of gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): Structural characterization and rheological behavior. **Carbohydrate Polymers**. *In Press*, 2018.

BARROSO, G. M. Sistemática das Magnoliophytas. In G. M. Barroso (Ed.), **Sistemática de angiospermas do Brasil-Parte II**, São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, p. 114-126, 1978.

BAILEY, L. A.; JAMSHIDI-PARSIAN, A.; PATEL, T.; KOONCE, N. A.; DIEKMAN, A. B.; CIFARELLI, C. P.; MARPLES, B.; GRIFFIN, R. J. Combined temozolomide and ionizing radiation induces galectin-1 and galectin-3 expression in a model of human glioma. **Tumor Microenvironment and Therapy**. v. 2, n. 1, p. 19-31, 2015.

BENEDETTI, M.; PONTIGGI, D.; RAGGIA, S.; CHENG, Z.; SCALONI, F.; FERRARI, S.; AUSUBEL F. M., CERVONE, F.; LORENZO, D., De. Plant immunity triggered by engineered in vivo release of oligogalacturonides, damage-associated molecular patterns. **PNAS**, v. 112, p. 5533-5538, 2015.

BENTO, J. F.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Isolation of an arabinogalactan from *Endopleura uchi* bark decoction and its effect on HeLa cells. **Carbohydrate Polymers**. v. 101, p. 871-877, 2014.

BERGMAN, M.; DJALDETTI, M.; SALMAN, H.; BESSLER, H. Effect of citrus pectin on malignant cell proliferation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 64, p. 44-47, 2010.

BERRIDGE, M. V., HERST, P. M., TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**. v. 11, p. 127-152, 2005.

BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 93, p. 385-389, 2004.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 484-489, 1973.

BOMGARDNER, M. M. Pushing pectin. **Chemical & Engineering News**, v. 91, n. 5, p. 20, 2013.

BRACONNOT, H. Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux. **Annales de Chimie et de Physique**. v. 28, n. 2, p. 173-178, 1825.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and Biochemistry of Plant cell Walls**. London: 1990.

BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 10, p. 724-732, 2010.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**. v. 344, p. 1879-1900, 2009.

CAGNONI, A. J.; SÁEZ, J. M. P.; RABINOVICH, G. A.; MARIÑO, K. V. Turning-Off Signaling by Siglecs, Selectins, and Galectins: Chemical inhibition of Glycan-Dependent interactions in Cancer. **Frontiers in Oncology**. v. 6, p. 1-21, 2016.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**. v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CANTU-JUNGLES, T. M.; MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; IACOMINI, M. Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food Chemistry**. v. 146, p. 492-499, 2014.

CANTU-JUNGLES, T. M.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M. C. Extraction and characterization of pectins from primary cell walls of edible açai (*Euterpe oleraceae*) berries, fruits of a monocotyledon palm. **Carbohydrate Polymers**. v. 158, p. 37-43, 2017.

CAPELETTO, C.; CONTERATO, G.; SCAPINELLO, J.; RODRIGUES, F. S.; COPINI, M. S.; KUHN, F.; TRES, M. V.; MAGRO, J. D.; OLIVEIRA, J. V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) seed extracts obtained by supercritical CO₂ and compressed n-butane. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 110, p. 32-38, 2016.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHAMAN, B. B.; WILHELM, G., et al (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. **Rockville American Society of Plant Physiologists**, p.52-108, 2000.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Campinas: FUNEP, 2000.

CHAN, S. Y.; CHOO, W. S.; YOUNG, D. J.; LOH, X. J. Pectin as a Rheology Modifier: Origin, Structure, Commercial Production and Rheology. **Carbohydrate Polymers**. v. 161, p. 118-139, 2017.

CHEN, C. H.; SHEU, M. T.; CHEN, T. F.; WANG, Y. C.; HOU, W. C.; LIU, D. Z.; CHUNG, T. C.; LIANG, Y. C. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. **Biochemical Pharmacology**. v. 72, p. 1001-1009, 2006.

CHIDOUH, A.; AOUADI, S.; HEYRAUD, A. Extraction: fractionation and characterization of water-soluble polysaccharide fractions from myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit. **Food Hydrocolloids**. v. 35, p. 733-739, 2014.

CIRIMINNA, R.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; HERNÁNDEZ, A. I. R.; PAGLIARO, M. Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**. v. 9, p. 368-377, 2015.

CIRIMINNA, R.; FIDALGO, A.; DELISI, R; ILHARCO, L. M.; PAGLIARO, M. Pectin production and global market. **Agro Food Industry Hi Tech**, v. 27, 17-20, 2016.

CLARK J. H.; PFALTZGRAFF L. A.; BUDARIN, V. L.; de BRUYN M. Microwave assisted citrus waste biorefinery. **Patent WO 2013150262 A1**, 2013.

CLARKE, A. E.; ANDERSON, R. L.; STONE, B. A. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan - proteins. **Phytochemistry**, v. 18, n. 4, p. 521-540, 1979.

COBS-ROSAS, M.; CONCHA-OLMOS, J.; WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C.; ZÚÑIGA-HANSENA, M. E. Assessment of antiproliferative activity of pectic substances obtained by different extraction methods from rapeseed cake on cancer cell lines. **Carbohydrate Polymers**. v. 117, p. 923-932, 2015.

COLODEL, C.; BAGATIN, R. M. das G.; TAVARES, T.; PETKOWICZ, C. L. de O. Cell wall polysaccharides from pulp and peel of cubiu: A pectin-rich fruit. **Carbohydrate Polymers**. v. 174, p. 226-234, 2017.

COLQUHOUN, A. Cell biology-metabolic crosstalk in glioma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 89, p. 171-181, 2017.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul**. Brasília, DF. Ministério do Meio Ambiente, 2011.

CORRÊA-FERREIRA, M. L.; FERREIRA, D. M.; DALLAZEN, J. L.; SILVA, A. M. S.; WERNER, M. F. P.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Gastroprotective effects and structural characterization of a pectic fraction isolated from *Artemisia campestris subsp maritima*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 107, p. 2395-2403, 2018.

COSTA, A. G. V.; F.GARCIA-DIAZ, D.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-blackberries. **Journal of Functional Foods**. v. 5, p. 539-549, 2013.

CRUZ, A. V. D. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil **Floresta e Ambiente**. v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; KRÜGER, R. L.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 98, p. 79-85, 2015.

DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Guarana powder polysaccharides: Characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food Chemistry**. v. 134, p. 1804-1812, 2012.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde**. v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, p. 60-71, 2007.

DONADO-PESTANA, C. M.; MOURA, M. H. C.; ARAUJO, R. L.; SANTIAGO, G. L.; BARROS, H. R. M.; GENOVESE, M. I. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current Opinion in Food Science**. *In Press*, 2018.

DUNN, G. P.; RINNE, M. L.; WYKOSKY, J.; GENOVESE, G.; QUAYLE, S. N.; DUNN, I. F.; HAHN, W. C. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. **Genes & Development**. v. 26, n. 8, p. 756-784, 2012.

ELIAZ, I.; MCCULLOCH, M. Methods for treating mammals with modified alginates and pectins. **Patent US6274566B1**, 1999.

EINHORN-STOLL, U. Pectin-water interactions in foods – From powder to gel. **Food Hydrocolloids**. *In Press*, 2017.

EMBRAPA FLORESTAS. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Valor nutricional da gabioba. Colombo, 2015. 1 fôlder. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/florestas/busca-de-publicacoes/> /publicacao/1027135/valor-nutricional-da-guabiroba>. Acesso em: 13 mar. 2017.

FAN, Y.; CHENG, H.; LI, S.; WANG, J.; LIU, D.; HAO, M.; GAO, X.; FAN, E.; TAI, G.; ZHOU, Y. Relationship of the inhibition of cell migration with the structure of ginseng pectic polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 81, p. 340-347, 2010.

FAN, Y.; SUN, C.; GAO, X.; WANG, F.; LI, X.; KASSIM, R. M.; TAI, G.; ZHOU, Y. Neuroprotective effects of ginseng pectin through the activation of ERK/MAPK and Akt survival signaling pathways. **Molecular Medicine Reports**. v. 5, p. 1185-1190, 2012.

FERNANDES, J. B. F.; VARGAS, V. M. F. Mutagenic and Antimutagenic Potential of the Medicinal Plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. **Phytoteraphy Research**. v. 17, p. 269-273, 2003.

FERREIRA, S. S.; PASSOS, P. P.; MADUREIRA P.; VILANOVA, M.; COIMBRA, M. A. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**. v.132, p. 378-386, 2015.

FERREIRA, D. F.; GARRUTI, D. S.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; WAGNER, R. Characterization of odor-active compounds in gabioba fruits (*Campomanesia xanthocarpa* O. BERG). **Journal of Food Quality**. v. 39, p. 90-97, 2016.

FRAUCHES, N. S.; do AMARAL, T. O.; LARGUEZA, C. B. D.; TEODORO, A. J. Brazilian Myrtaceae Fruits: A Review of Anticancer Proprieties. **British Journal of Pharmaceutical Research**. v. 12, n. 1, p. 1-15, 2016.

GAN, C.-Y.; LATIF, A. A. Extraction of antioxidant pectic-polysaccharide from mangosteen (*Garcinia mangostana*) rind: Optimization using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**. v. 83, p. 600-607, 2011.

GAO, X.; ZHI, Y.; ZHANG, T.; XUE, H.; WANG, X.; FODAY, A. D.; TAI, G.; ZHOU, Y. Analysis of the neutral polysaccharide fraction of MCP and its inhibitory activity on galectin-3. **Glycoconjugate Journal**. v. 29, p. 159-165, 2012.

GAO, Q-H.; FU, X.; ZHANG, R.; WANG, Z.; GUO, M. Neuroprotective effects of plant polysaccharides: A review of the mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 106, p. 749–754, 2018.

GASPAR, Y.; JOHNSON, K.L.; MCKENNA, J.A.; BACIC, A.; SCHULTZ, C.J. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. **Plant Molecular Biology**. v. 47, n. 1-2, p. 161–176, 2001.

GLINSKY, V. V.; RAZ, A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. **Carbohydrate Research**. v. 344, p. 1788-1791, 2009.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydrate Research**. v. 142, n. 2, p. 253-267, 1985.

GRIGIO, M. L.; CHAGAS, E. A.; RATHINASABAPATHI, B.; CHAGAS, P. C.; SILVA, A. R. V.; SOBRAL, S. T. M.; OLIVEIRA, R. R. Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit. **African Journal of Food Science**. v. 11, n. 5, p. 124-129, 2017.

GRONDE, T.V.; HARTOG, A.; HEES, C. V.; PELLIKAAN, H.; PIETERS, T. Systematic review of the mechanisms and evidences behind the hypocholesterolaemic effects of HPMC, pectin and chitosan in animal trials. **Food Chemistry**. v. 199, p. 746-759, 2016.

GUAADAOU, A.; BENAICHA, S.; ELMAJDOUB, N.; Mohammed BELLAOU, M.; HAMAL, A. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**. v. 3, n. 3, p. 174-179, 2014

HASTON, E.; RICHARDSON, J. E.; STEVENS, P. F.; CHASE, M. W.; HARRIS, D. J. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 161, p. 128-131, 2009.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Saúde (Santa Maria)**. v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.

HOFTE, H.; VOUXEUR, A.; Plant cell wall. **Current Biology Magazine**. v. 27, p. R853-R909, 2017.

HOMCZINSKI, I.; FILHO, A. F.; RETSLAFF, F. A. D. S.; DIAS, A. N.; FIGUEIREDO, A. P. M.; CORRÊA, A. J. M.; LERNER, J. Biometric characterization of *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg. in an araucaria forest. **Acta Biológica Catarinense**. v. 4, n. 2, p. 91-99, 2017.

HOUBEN, K.; JOLIE, R. P.; FRAEYE, I.; LOEY, A. M. V.; HENDRICKX, M. E. Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. **Carbohydrate Research**. v. 346, n. 9, p. 1105-1111, 2011.

HUA, D.; ZHANG, D.; HUANG, B.; YI, P.; YAN, C. Structural characterization and DPPH. radical scavenging activity of a polysaccharide from Guara fruits. **Carbohydrate Polymers**. v. 103, n. 1, p. 143-147, 2014.

HUETTEMANN, E.; SAKKA, S. G. Anaesthesia and anticancer chemotherapeutic drugs. *Current Opinion in Anaesthesiology*. v. 18, n. 3, p. 307-314, 2005.

INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018, 2018

INFANTE, J.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. **PLoS ONE**. v. 11, n. 4, p. 1-13, 2016.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Isolation and characterization of a boron rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**. v. 284, n. 1, p. 1-9, 1996.

JARVIS M. C.; FORSYTH, W.; DUNCAN, H. J. A Survey of the Pectic Content of Nonlignified Monocot Cell Walls. **Plant Physiology**. v. 88, p. 309-314, 1988.

JAYARAM, S.; KAPOOR, S.; DHARMESH, S. M. Pectic polysaccharide from corn (*Zea mays* L.) effectively inhibited multistep mediated cancer cell growth and metastasis. **Chemico-Biological Interactions**. v. 235, p. 63-75, 2015.

JHANWAR-UNIYAL, M.; LABAGNARA, M.; FRIEDMAN, M.; KWASNICKI, A.; MURALI. R. Glioblastoma: Molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. **Cancers**, v. 7, n. 2, p. 538–555, 2015.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**. n. 89, p. 114-133, 2011.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. In: Whistler R. L., Wolfrom, M. L & BeMiller J. N. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York and London: Academic Press, p. 36-38, 1965.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**. v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

JURATLI, T. A.; SCHACKERT, G.; KREX, D. Current status of local therapy in malignant gliomas - A clinical review of three selected approaches. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 139, n. p. 341-358, 2013.

KATAOKA, V. M. F.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 15, n. 1, p. 121-129, 2013

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. de. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 846-857, 2008.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A. D.; PANIGAS, T. F.; BELL, K. C.; OLIVEIRA, M. F. D.; BARICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. F.; SANTOS, A. R. S. D.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J.; VIECILI, P. R. N. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, n. p. 299-305, 2010.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A. D.; ROSSATO, M. F.; TREVISAN, G.; WALKER, C. I. B.; LEAL, C. A. M.; BORGES, D. O.; SCHETINGER, M. R. C.; MORESCO, R. N.; DUARTE, M. M. M. F.; SANTOS, A. R. S. D.; VIECILI, P. R. N.; FERREIRA, J. Antiplatelet, antithrombotic, and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-8, 10.1155/2012/954748, 2012.

KLAFKE, J. Z.; PEREIRA, R. L. D.; HIRSCH, G. E.; PARISI, M. M.; PORTO, F. G.; ALMEIDA, A. S. D.; RUBIN, F. H.; SCHMIDT, A.; BEUTLER, H.; NASCIMENTO, S.; TREVISAN, G.; BRUSCO, I.; OLIVEIRA, S. M. D.; DUARTE, M. M. M. F.; DUARTE, T.; VIECILI, P. R. N. Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr-KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *Campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid. **Phytomedicine**. v. 23, n. 11, p. 1227-1234, 2016.

KLOSTERHOFF, R. R.; BARK, J. M.; GLÄNZEL, N. M.; IACOMINI, M.; MARTINEZ, G. R.; WINNISCHOFER, S. M. B.; CORDEIRO, L. M. C. Structure and intracellular antioxidant activity of pectic polysaccharide from acerola (*Malpighia emarginata*). **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 106, p. 473-480, 2018.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**. v. 182, n.1, p.16-19, 1989.

LECLERE, L.; CUTSEM, P. V.; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. **Frontiers in Pharmacology**. v. 4, p. 1-8, 2013.

LECLERE, L.; FRANSOLET, M.; CAMBIER, P.; BKASSINY, S. E.; TIKAD, A.; DIEU, M.; VINCENT, S. P.; CUTSEM, P. V.; MICHIELS, C. Identification of a cytotoxic molecule in heat-modified citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**. v. 137, p. 39-51, 2016.

LEE, E. H.; PARK, H.-R.; SHIN, M.-S.; CHO, S. Y.; CHOI, H.-J.; SHIN, K.-S. Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean *Citrus Hallabong*. **Carbohydrate Polymers**. v. 111, p. 72-79, 2014.

LEIVAS, C. L.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Pectic type II arabinogalactans from starfruit (*Averrhoa carambola* L.). **Food Chemistry**, v. 199, p. 252-257, 2016.

LI, J.; LI, Q. W.; PENG, Y.; ZHAO, R.; HAN, Z. S.; GAO, D. W. Protective effects of fraction a of polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne on thymusin tumor-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 350–356. 2010.

LIN, L.; WANG, P.; DU, Z.; WANG, W.; CONG, Q.; ZHENG, C.; JINA, C.; DING, K.; SHAO, C. Structural elucidation of a pectin from flowers of *Lonicera japonica* and its antipancreatic cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 88, n. p. 130-137, 2016.

LISBÔA, G. N., KINUPP, V. F., & BARROS, I. B. I. *Campomanesia xanthocarpa*-Gabioba. In: CORADIN, L., SIMINSKI, A., & REIS, A. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Sul**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, p. 159-162, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Ed. 3, p. 384, 2009.

MAJEE, S. B.; AVLANI, D.; GOSH, P.; BISWAS, G. R. Therapeutic and pharmaceutical benefits of native and modified plant pectin. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 12, n.1, p. 1-6, 2018.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 94, p. 55-57, 2004.

MARKOV, P. A.; POPOV, S. V.; NIKITINA, I. R.; OVODOVA, R. G.; OVODOV, Y. S. Anti-Inflammatory Activity of Pectins and Their Galacturonan Backbone. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**. v. 37, n. 7, p. 817-821, 2011.

MAXWELL, E. G.; BELSHAW, N. J.; WALDRON, K. W.; MORRIS, V. J. Pectin - An emerging new bioactive food polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology**. v. 24, p. 64-73, 2012.

MAXWELL, E.; MORRIS, V.; WALDRON, K.; BELSHAW, N. Potato rhamnogalacturonan I reduces colon cancer cell proliferation via a galectin-3 independent mechanism. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 74, n. p. 66, 2015.

MAXWELL, E. G.; COLQUHOUN, I. J.; CHAU, H. K.; HOTCHKISS, A. T.; WALDRON, K. W.; MORRIS, V. J.; BELSHAW, N. J. Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains. **Carbohydrate Polymers**. v. 136, p. 923-929, 2016.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 11, n. p. 266-277, 2008.

MORENO, L.; NASCIMENTO, R. F. DO.; ZIELINSKI, A. A. F.; WOSIACKI, G.; CANTERI, M. H. G. Extraction and characterization of pectic substances in *Myrciaria cauliflora* (Jaboticaba sabará) fruit. **Revista Stricto Sensu**. v. 1, n. 1, p. 1- 11, 2016.

MORRIS, V. J.; BELSHAW, N. J.; WALDRON, K. W.; MAXWELL, E. G. The bioactivity of modified pectin fragments. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre 1**. v. 1, n. 1, p. 21-37, 2013.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 63, p. 55-63, 1983.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**. v. 72, p. 145-171, 2001.

MUL ER-MAATSCH, J.; CALIGIANI, A.; TEDESCHI, T.; ELST, K.; SFORZA, S. Simple and Validated Quantitative ¹H NMR Method for the Determination of Methylation, Acetylation, and Feruloylation Degree of Pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 9081–9087, 2014.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 51, n. p. 681-689, 2012.

MUNARIN, F.; PETRINI, P.; GENTILINI, R.; PILLAI, R. S.; DIRÈ, S.; TANZI, M. C.; SGLAVO, V. M. Micro- and nano-hydroxyapatite as active reinforcement for soft biocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 72, n. p. 199-209, 2015.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. D.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. v. 403, p. 853–858, 2000.

M'SAKNI, N. H.; MAJDOUB, H.; ROUDESLI, S.; PICTON, L.; CERF, D. L.; RIHOUEY, C.; MORVAN, C. Composition, structure and solution properties of polysaccharides extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. **European Polymer Journal**. v. 42, n. 4, p. 786-795, 2006.

NAGEL, A.; SIRISAKULWAT, S.; CARLE, R.; NEIDHART, S. An acetate hydroxide gradient for the quantitation of the neutral sugar and uronic acid profile of pectins by HPAEC-PAD without postcolumn pH adjustment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, n. 9, p. 2037-2048, 2014.

NAQASH, F.; MASOODI, F. A.; RATHER, S. A.; WANI, S. M.; GANI, A. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin – A Review. **Carbohydrate Polymers**. v. 168, p. 227-239, 2017.

NASCIMENTO, G. E. do; CORSO, C. R., P.; WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers**. v. 116, p. 300-306, 2015.

NASCIMENTO, A. M.; MARIA-FERREIRA, D.; SOUZA, E. F. J. de.; SOUZA, L. M. De.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F. de P.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and chemical characterization of a polysaccharide fraction from leaves of *Croton cajucara* Benth. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 95, p. 153-159, 2017a.

NASCIMENTO, G. E. do.; WINNISCHOFER, S. M. B.; RAMIREZ, M. I.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. The influence of sweet pepper pectin structural characteristics

on cytokine secretion by THP-1 macrophages. **Food Research International**. v. 102, p. 588-594, 2017b.

NASCIMENTO, G. E. do.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. New findings on green sweet pepper (*Capsicum annum*) pectins: Rhamnogalacturonan and type I and II arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**. v. 171, p. 292-299, 2017c.

NERI-NUMA, I. A.; SANCHO, R. A. S.; PEREIRA, A. P. A.; PASTORE, G. M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**. v. 103, p. 345-360, 2018.

NEVES, S. C.; GOMES, D. B.; SOUSA, A.; BIDARRA, S. J.; PETRINI, P.; MORONI, L.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L. Biofunctionalized pectin hydrogels as 3D cellular microenvironments. **Journal of Materials Chemistry B**. v. 3, p. 2096-2108, 2015.

NOREEN, A.; NAZLIC, Z-i-U.; AKRAMA, J.; RASULB, I.; MANSHAA, N. Y.; IQBALD, R.; TABASUMA, S.; ZUBERA, M.; ZIA, K. M. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 254-272, 2017.

NORTHCOTE, D. H. Chemistry of the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 23, p. 113-132, 1972.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathologica**. v. 109, n. p. 93-108, 2005.

OMURO, A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. **Jama**, v. 310, n. 17, p. 1842, 2013.

OTERO, J. S.; HIRSCH, G. E.; KLAFKE, J. Z.; PORTO, F. G.; ALMEIDA, A. S. D.; NASCIMENTO, S.; SCHMIDT, A.; SILVA, B. D.; PEREIRA, R. L. D.; JASKULSKI, M.; PARISI, M. M.; GUARDA, N. D. S.; MORESCO, R. N.; AITA, C. A. M.; VIECILI, P. R. N. Inhibitory effect of *Campomanesia xanthocarpa* in platelet aggregation: Comparison and synergism with acetylsalicylic acid. **Thrombosis Research**. v. 154, n. p. 42-49, 2017.

PARK, H. R.; PARK, S. B.; HONG, H. D.; SUH, H. J.; SHINA, K. S. Structural elucidation of anti-metastatic rhamnogalacturonan II from the pectinase digest of citrus peels (*Citrus unshiu*). **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 94, p. 161-169, 2017a.

PARK, H. R.; HWANG, D.; SUH, H. J.; YU, K. W.; KIM, T. Y.; SHIN, K. S. Antitumor and Antimetastatic Activities of Rhamnogalacturonan-II-Type Polysaccharide Isolated from Mature Leaves of Green Tea *via* Activation of Macrophages and Natural Killer Cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 99, p. 179-186, 2017b.

PASTORI, T.; FLORES, F. C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SILVA, C. B. D.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Genotoxic effects of *Campomanesia*

xanthocarpa extracts on *Allium cepa* vegetal system. **Pharmaceutical Biology**. v. 51, n. 10, p. 1249-1255, 2013.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, K. N. C.; VIKRAM, A. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 8142–8160, 2009.

PAULY, M; KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 13, p. 305-312, 2010.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 3061-3067, 2012.

PEREIRA, M. C.; HILL, L. E.; ZAMBIAZI, R. C.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.; GOMES, C. L. Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. **LWT - Food Science and Technology**. v. 63, p. 100-107, 2015.

PETKOWICZ, C. L. O.; VRIESMANN, L. C.; WILLIAMS, P. A. Pectins from food waste: Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. **Food Hydrocolloids**. v. 65, p. 57-67, 2017.

POINTER, K. B. PAUL, A. C.; MICHAEL, Z.; BAHAUDDEEN M. A. JOHN, S. K. Glioblastoma cancer stem cells: Biomarker and therapeutic advances. **Neurochemistry International**, v. 71, n. 1, p. 1–7, 2014.

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; KHRAMOVA, D. S.; MARKOV, P. A.; SMIRNOV, V. V.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Pectic polysaccharides of the fresh plum *Prunus domestica* L. isolated with a simulated gastric fluid and their anti-inflammatory and antioxidant activities. **Food Chemistry**. v. 143, p. 106-113, 2014.

PRADO, S. B. R. D.; FERREIRA, G. F.; HARAZONO, Y.; SHIGA, T. M.; RAZ, A.; CARPITA, N. C.; FABI, J. P. Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. **Scientific Reports**. v. 7, p. 1-17, 2017.

RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. **Nature Reviews | Cancer**. v. 3, n. p. 489-501, 2003.

RASBAND, M. N. Glial contributions to neural function and disease. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, p. 1–26, 2015.

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E. D. **Documento 129: Espécies Frutíferas Nativas do Sul do Brasil**. Pelotas, RS. Embrapa, 2004

RAZ, A.; PIENTA, K. J. Method for inhibiting cancer metastasis by oral administration of soluble modified pectin. **Patent. US 5834442 A**. 1998.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. A. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**. v. 57, p. 929-967, 2001.

RIZWANULLAH, M.; AMIN, S.; MIR, S. R.; FAKHRI, K. U.; RIZVI, M. M. A. Phytochemical based nanomedicines against cancer: Current status and future prospects. **Journal of Drug Targeting**. p. 1-22, <https://doi.org/10.1080/1061186X.1062017.1408115>, 2017.

ROPELLATO, J.; CARVALHO, M. M.; FERREIRA, L. G.; NOSEDA, M. D.; ZUCONELLI, C. R.; GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; KENSKI, J. C. N.; NASATO, P. L.; WINNISCHOFER, S. M. B.; DUARTE, M. E. R. Sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**. v. 117, p. 476-485, 2015.

SANT'ANNA, L. S.; MERLUGO, L.; EHLE, C. S.; LIMBERGER, J.; FERNANDES, M. B.; SANTOS, M. C.; MENDEZ, A. S. L.; PAULA, F. R.; MOREIRA, C. M. Chemical Composition and Hypotensive Effect of *Campomanesia xanthocarpa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2017, p. 1-11, 2017.

SANTOS, M. S.; CORREIA, C. H.; PETKOWICZ, C. L. D. O.; CÂNDIDO, L. M. B. Evaluation of the Technological Potential of Gabiroba [*Campomanesia xanthocarpa* Berg] Fruit. **Journal of Nutrition and Food Sciences**. v. 2, n. 9, p. 1-7, 2012.

SARMENTO, M.; SILVA, A.; SILVA, C. Recursos genéticos de frutas da família Myrtaceae no Sul do Brasil, **Magistra**, v. 24, p. 250-262, 2012.

SCHRECKINGER, M. E.; LOTTON, J.; LILA, M. A.; MEJIA, E. G. Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization. **Journal of Medicinal Food**. v. 13, n. 2, p. 233-246, 2010.

SEIFERT, G.J.; ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. **Annual Review of Plant Biology**. v. 58, p. 137-161, 2007.

SERAGLIO, S. K. T.; SCHULZ, M.; NEHRING, P.; BETTA, F.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**. v. 239, p. 649-656, 2018.

SHEN, W.; HU, J. A.; ZHENG, J. S. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. **Journal of International Medical Research**. v. 42, n. 1, p. 164-172, 2014.

SHI, H.; YU, L.; SHI, Y.; LU, J.; TENG, H.; ZHOU, Y.; SUN, L. Structural Characterization of a Rhamnogalacturonan I Domain from Ginseng and Its Inhibitory Effect on Galectin-3. **Molecules**. v. 22, n. p. 1-10, 2017.

SOUTO-MAIOR, J. F. A.; REIS, A. V.; PEDREIRO, L. N.; CAVALCANTI, O. A. Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. **Polymer International**. v. 59, p. 127-135, 2010.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALVAGNINI, L. E.; SANTOS, E.; SILVA, V. Y. A.; MOREIRA, R. R. D.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. Antidiarrheal Activity of *Campomanesia xanthocarpa* Fruit. **Journal of Medicinal Food**. v. 14, n. 5, p. 528-531, 2011.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food Polysaccharides and Their Applications**. Estados Unidos: CRC Press, p. 702, 2006.

STUPP, R. BRADA, M.; VAN DEN BENT, M. J.; TONN, J.-C.; PENTHEROUDAKIS, G. High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 25, n. April, p. 93–101, 2014.

STURM, D.; BENDER, S.; JONES, D. T. W.; LICHTER, P.; GRILL, J.; BECHER, O.; HAWKINS, C.; MAJEWSKI, J.; JONES, C.; COSTELLO, J. F.; IAVARONE, A.; ALDAPE, K.; BRENNAN, C. W.; JABADO, N.; PFISTER, S. M. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. **Nature Reviews | Cancer**. v. 14, p. 92-107, 2014.

TABOADA, E.; FISHER, P.; JARA, R., ZÚÑIGA, E.; GIDEKEL, M.; CABRERA, J. C. Isolation and characterisation of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits. **Food Chemistry**. v. 123, n. 3, p. 669-678, 2010.

TAMIELLO, C. S.; NASCIMENTO, G. E. D.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Arabinogalactan from edible jambo fruit induces different responses on cytokine secretion by THP-1 macrophages in the absence and presence of proinflammatory stimulus. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 107, p. 35-41, 2018.

TANAKA, S.; LOUIS, D. N.; CURRY, W. T.; BATCHELOR, T. T.; DIETRICH, J. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? . **Nature Reviews | Clinical Oncology**. v. 10, p. 14-26, 2013.

THE PLANT LIST - MYRTACEAE. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae/>>. Acesso em : 23 Dez, 2017.

TOGOLA, A.; INNGJERDINGEN, M.; DIALLO, D.; BARSETT, H.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN, T. E. et al. Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterisation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 423–431, 2008.

VALLILO, M. I.; MORENO, P. R. H.; OLIVEIRA, E. de.; LAMARDO, L. C. A.; GARBELOTTI, M. L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231-237, 2008.

VAYSSADE, M.; SENGKHAMPARN, N.; VERHOEF, R.; DELAIGUE, C.; GOUNDIAM, O.; VIGNERON, P.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A.; NAGEL, M. D. Antiproliferative and Proapoptotic Actions of Okra Pectin on B16F10 Melanoma Cells. **Phytoteraphy Research**. v. 24, p. 982-989, 2010.

VENDRAMINI, L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 71, p. 195-198, 2000.

VERONOVSKI, A.; TKALEC, G.; KENEZ, Z.; NOVAK, Z. Characterisation of biodegradable pectin aerogels and their potential use as drug carriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 272-278, 2014.

VIDAL, S.; DOCOA, T.; WILLIAMSA, P.; PELLERINA, P.; YORKC, W. S.; O'NEILL, M. A.; GLUSHKAC, J.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: Evidence for the backbone location of the aceric acid containing oligoglycosyl side chain. **Carbohydrate Research**. v. 326, p. 277-294, 2000.

VIECILI, P. R. N.; BORGES, D. O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECILI, E.; MELO, R. D.; TREVISAN, G.; SILVA, M. A. D.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; KLAFKE, J. Z. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**. v. 234, p. 85-92, 2014.

VINAGRE, A. S.; RÖNNAU, A. D. S. R. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U. D.; WILLAND, E. F.; SUYENAGA, E. S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; McCANN, M. C.; ULYSKOV, P. VORAGEN, A. G. J.; VISSER, G. F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**. v. 132, p. 1781-1789, 2003.

VLADOIU, M. C.; LABRIE, M.; ST-PIERRE, Y. Intracellular galectins in cancer cells: Potential new targets for therapy (Review). **International Journal of Oncology**. v. 44, p. 1001-1014, 2014.

VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W.; THIBAUT, J. F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. Pectins. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, p. 287-340, 1995.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**. v. 20, p. 263-275, 2009

WANG, X. S.; LIU, L.; FANG, J. N. Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 95–101, 2005.

WANG, J.; SUN, C.; ZHENG, Y.; PAN, H.; ZHOU, Y.; FAN, Y. The effective mechanism of the polysaccharides from *Panax ginseng* on chronic fatigue syndrome. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, p. 530–538, 2014.

WANG, H.; GAO, T.; DUB, Y.; YANG, H.; WEI, L.; BIB, H.; NI, W. Anticancer and immunostimulating activities of a novel homogalacturonan from *Hippophae rhamnoides* L. berry. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, n. p. 288–296, 2015a.

WANG, Y.; HUANG, M.; SUN, R.; PAN, L. Extraction, characterization of a Ginseng fruits polysaccharide and its immune modulating activities in rats with Lewis lung carcinoma. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 215–221, 2015b.

WANG, J.; SHUZHEN, H.; SHAOPING, N.; YU, Q.; XIE, M. Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. p. 2016.

WANG, S.; LI, P.; LU, S. M.; LING, Z. Q. Chemoprevention of Low-Molecular-Weight Citrus Pectin (LCP) in Gastrointestinal Cancer Cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 6, p. 746–756, 2016.

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews | Neuroscience**, v. 12, p. 495–508, 2011.

WICKER, L.; KIM, Y.; KIM M-J.; THIRKIELD, B.; LIN, Z.; JUNG, J. Pectin as a bioactive polysaccharide - Extracting tailored function from less. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 251–259, 2014.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97–104, 2006.

WOENSEL, M. V.; WAUTHOZ, N.; ROSIÈRE, R.; AMIGHI, K.; MATHIEU, V.; LEFRANC, F.; GOOL, S. W. V.; VLEESCHOUWER, S. D. Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM? **Cancer**, v. 5, p. 1020–1048, 2013.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER R. L., WOLFROM, M. L.; BEMILLER J. N. **Methods in carbohydrate chemistry**. New York and London: Academic Press Inc., p. 65–68, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER R. L., WOLFROM, M. L.; BEMILLER J. N. **Methods in carbohydrate chemistry**. New York and London: Academic Press Inc., p. 211–215, 1963b.

WU, X. M.; GAO, X. M.; TSIM, K. W.; TU, P. F. An arabinogalactan isolated from the stems of *Cistanche deserticola* induces the proliferation of cultured lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 37, n. 5, p. 278-82, 2005.

WYATT, P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**. v. 272, n. 1, p. 1-40, 1993.

XU, H.; TAI, K.; WEI, T.; YUAN, F.; GAO, Y. Physicochemical and *in vitro* antioxidant properties of pectin extracted from hot pepper (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* (Fingerh.)) residues with hydrochloric and sulfuric acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 97, n. 14, p. 4953-4960, 2017.

YAMAGUCHI, K. K. D. L.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. D. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**. v. 179, p. 137-151, 2015.

YAN, J.; KATZ, A. PectaSol-C Modified Citrus Pectin Induces Apoptosis and Inhibition of Proliferation in Human and Mouse Androgen-Dependent and -Independent Prostate Cancer Cells. **Integrative Cancer Therapies**. v. 9, n. 2, p. 197-203, 2010.

YAN, C.; LEE, J.; KONG, F.; ZHANG, D. Anti-glycated activity prediction of polysaccharides from two guava fruits using artificial neural networks. **Carbohydrate Polymers**. v. 98, p. 116-121, 2013.

YANG, C.; GOU, Y.; CHEN, J.; AN, J.; CHEN, W.; HU, F. Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula*. **Carbohydrate Polymers**. v. 98, p. 886-895, 2013.

YAPO, B. M. Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 373-385, 2011a.

YAPO, B. M. Pectin Rhamnogalacturonan II: On the "Small stem with four branches" in the primary cell walls of plants. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, p. 2-11, 2011b.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 4-19, 2007.

ZHANG, W.; XU, P.; ZHANG, H. Pectin in cancer therapy: A review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 44, n. p. 258-271, 2015.

ZHANG, Z.; KONG, F.; NI, H.; WAN, J.-B.; HUA, D.; YAN, C. Structural characterization, α -glucosidase inhibitory and DPPH. scavenging activities of polysaccharides from guava. **Carbohydrate Polymers**. v. 144, p. 106-114, 2016.

ZHI, Z.; CHEN, J.; LI, S.; WANG, W.; HUANG, R.; LIU, D.; DING, T.; LINHARDT, R. J.; CHEN, S.; YE, X. Fast preparation of RG-I enriched ultra-low molecular weight pectin by an ultrasound accelerated Fenton process. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 541-551, 2017.

ZIMM, B. H. Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variations of light scattering; preliminary results on polystyrene solutions. **The Journal of Chemical Physics**. v. 16, n. 12, p. 1099-1116, 1948.